

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 4146

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Mme Renée GOLDBERG

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Nature et rôle des composés à mannose des
semences de quelques Liliacées.

Soutenue le 8 Avril 1970

devant la Commission d'Examen

MM. CHOUARD
ULRICH
DEDONDER
DUPERON

Président
Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550203_0005

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 4146

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Mme Renée GOLDBERG

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Nature et rôle des composés à mannose des
semences de quelques Liliacées.

Soutenue le 8 Avril 1970

devant la Commission d'Examen

MM. CHOUARD	Président
ULRICH	Examineurs
DEDONDER	
DUPERON	



Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Physiologie végétale de la Faculté des Sciences de Paris, que dirige Monsieur le Professeur CHOUARD, à qui j'exprime ma déférente et profonde gratitude pour la bienveillance qu'il m'a toujours manifestée et les larges possibilités de travail dont j'ai pu, grâce à lui, bénéficier.

J'adresse à Monsieur le Professeur ULRICH l'expression de ma vive reconnaissance pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé et pour avoir bien voulu accepter de critiquer et juger ce mémoire.

Je remercie Monsieur le Professeur DEDONDER d'avoir bien voulu participer à ce jury.

Que Monsieur le Professeur DUPERON qui a inspiré et guidé ce travail, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance. C'est à lui que je dois l'essentiel de ma formation scientifique et la bonne réalisation de ce travail.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur GUERN qui a bien voulu m'accepter dans son équipe.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur COURTOIS qui m'a accueilli quelques jours dans son laboratoire, me permettant ainsi de mener à bien les chromatographies de glucides méthylés.

C'est grâce à Monsieur J.C.ROLAND que l'étude en microscopie électronique a pu être effectuée. Qu'il trouve ici l'expression de mon amicale reconnaissance.

J'ai enfin à remercier mes camarades de Laboratoire pour leur esprit d'entraide et leur complaisance à mon égard, et tout particulièrement Monsieur LECHEVALLIER qui a guidé mes premiers essais de chromatographie en phase gazeuse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.

pages

ETUDE DES COMPOSES A MANNOSE CONTENUS DANS LES SEMENCES DE CERTAINES LILIACEES.

A. Recherche du mannose et des composés à mannose, dans les graines de certaines Liliacées.	
Etude des glucides solubles.....	15
Etude des polysaccharides entraînés par l'eau.....	16
Etude des substances insolubles après les extractions précédentes.....	20
B. Etude des polysaccharides à mannose des graines de trois espèces de Liliacées : <i>Asparagus officinalis</i> , <i>Endymion nutans</i> , <i>Allium cepa</i> .	
I. <i>Asparagus officinalis</i> .	
Techniques d'extraction.....	20
Etude de la composition chimique des différentes fractions obtenues après les extractions sodiques.....	21
Etude de l'homogénéité des polysaccharides.....	24
Détermination de la forme optique des hexoses constitutifs des polysaccharides.....	29
Etude de la structure des polysaccharides.....	40
II. Polysaccharides des graines d' <i>Endymion nutans</i>	45
III. Polysaccharides des graines d' <i>Allium cepa</i>	51
C. Localisation des glucomannanes dans les cellules et étude de leur structure physique.	
Examen de coupes réalisées au travers de quelques graines...	53
Examen des glucomannanes en lumière polarisée.....	54
Analyse des spectres de diffraction des rayons X par les polysaccharides.....	54

Conclusion.

ETUDE DE L'EVOLUTION DES QUANTITES DES COMPOSES A MANNOSE ET DE LEUR NATURE AU COURS DE LA MATURATION ET DE LA GERMINATION DES GRAINES DE CERTAINES LILIACEES.

A. Etude de la maturation des graines d' <i>Endymion nutans</i> .	
Evolution des diverses fractions glucidiques au cours de la maturation des graines d' <i>Endymion nutans</i>	58
Recherche de la présence et du rôle de composés de poids moléculaire intermédiaire.....	66
Etude histologique et cytologique des graines au cours de la maturation.....	72
Conclusion	
B. Etude de la germination des graines d' <i>Asparagus officinalis</i> .	
Evolution de la quantité et de la composition des diverses fractions glucidiques	77

Etude histologique et cytologique des organes de réserve au cours de la germination.....	85
Etude comparée de l'albumen et du cotylédon au cours de la germination.....	88

ETUDE DES SYSTEMES ENZYMATIQUES SUSCEPTIBLES D'INTERVENIR DANS LA DEGRADATION ET L'UTILISATION DES GLUCOMANNANES AU COURS DE LA GERMINATION.

A. <u>Etude "in vitro" des mécanismes de dégradation des glucomannanes</u>	
Etude de l'hydrolyse "in vitro" des glucomannanes d'Asperge par un extrait enzymatique.....	95
Analyse des activités osidasiques de l'extrait protéique....	101
B. <u>Evolution au cours de la germination, des activités enzymatiques susceptibles d'intervenir dans la dégradation des glucomannanes.</u>	
Evolution des activités osidasiques et polysaccharasiques au cours de la germination des graines d'Asperge.....	105
Etude de diverses activités osidasiques.....	107
C. <u>Etude des mécanismes pouvant intervenir "in vivo" dans la dégradation et l'utilisation des glucomannanes au cours de la germination des graines d'Asperge.</u>	
Localisation des phénomènes dégradatifs.....	117
Etude du mécanisme dégradatif.....	122
Etude de l'utilisation du mannose par des graines germées d'asperge.....	123
<u>CONCLUSIONS GENERALES ET DISCUSSION.....</u>	129
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	135

I N T R O D U C T I O N

Les premiers travaux sur les polysaccharides ont surtout concerné l'amidon, la cellulose et les polyfructosanes, puis les recherches se sont diversifiées en s'orientant essentiellement dans les directions suivantes:

- l'étude des hémicelluloses des arbres: ces travaux sont surtout menés dans des pays où l'industrie du bois est importante (I4.67 IO9);
- l'étude des polysaccharides utilisés dans l'alimentation (IOI)
- l'étude des polysaccharides entrant dans la catégorie des gommes et mucilages (II5)

Les polysaccharides des graines, par contre, comme le signalait B.N. STEPANENKO en 1960 (IOI) n'ont été isolés que dans un nombre relativement peu élevé d'espèces. Dès le début de ce siècle pourtant, HERISSEY et ses collaborateurs avaient mis en évidence la présence de galactomannanes dans les semences de Gleditschia Triacanthos (43.48). Depuis, les hémicelluloses des graines ont été étudiées surtout en Angleterre par l'équipe de HIRST et JONES (3.4.5.49) et à la Faculté de Pharmacie de Paris dans le laboratoire de Monsieur le Professeur COURTOIS (24.25)

La structure de diverses galactomannanes et glucomannanes a ainsi été déterminée. De plus, divers travaux ont mis en évidence la présence d'inuline dans les akènes de *Dahlia* (I5), et de glucomannanes dans les graines de *Melampyre* (27), et de certaines monocotylédones (6I.3.5). Nous nous sommes proposé, au début de ce travail, de rechercher la présence de polysaccharides contenant du mannose dans quelques semences de Liliacées. En effet, des glucomannanes avaient déjà été signalées dans les organes de réserve des plantes de cette famille (bulbes de lys (6), graines d'asperges (6I)...). De plus, le type d'hémicelluloses avait été isolé à partir de graines d'espèces appartenant à des familles très voisines (5). Dans la plupart des cas, les travaux se sont limités à l'étude de la composition chimique et de la structure des molécules de polysaccharides. Au cours des dix dernières années, cependant, divers chercheurs se sont intéressés aux systèmes enzymatiques intervenant dans la biosynthèse des polysaccharides, et, ont mis en évidence, le rôle des " nucléotides sucres " comme intermédiaires de la synthèse de ces constituants. C'est ainsi que LELOIR et collaborateurs réussirent en 1961 la synthèse de l'amidon à partir d'U.D.P. Glucose et d'un extrait végétal (34). Depuis, de nombreux polysaccharides ont ainsi été synthétisés " in vitro ".

ex:-la cellulose, à partir de G.D.P.Glucose (I3)
 -des glucomannanes, à partir de G.D.P. Mannose (3I.32)
 -l'amidon, à partir d'A.D.P. Glucose (35)
 -des xylanes, à partir d'U.D.P. Xylose (IO.33)
 -des acides polygalacturoniques, à partir d'acide U.D.P.
 galacturonique (II0)

Par ailleurs, bien peu de faits ont été rapportés quant au rôle physiologique des polysaccharides dans les graines (en dehors de l'amidon) si l'on excepte le travail de M. KEUSCH, publié en 1968 (56), sur l'utilisation des mannanes au cours de la germination des graines de Dattes. Cet auteur a montré que les mannanes étaient hydrolysées dans une " zone de dissolution " située au voisinage du haustorium. Le mannose, ainsi libéré est aussitôt transformé en saccharose, ce glucide représentant une forme de migration vers les organes en voie de formation. Compte tenu du peu de renseignements obtenus dans ce domaine, lorsque nous avons entrepris ce travail, nos recherches ont été orientées dans les directions suivantes:

1°) la recherche de composés à mannose et l'étude de leur structure ainsi que de la localisation de ces substances dans diverses semences de liliacées.

2°) l'étude de l'évolution des quantités des composés à mannose et de leur nature au cours de la maturation et de la germination de certaines semences en déterminant à divers stades:

- . les quantités des diverses fractions glucidiques
- . la composition de ces fractions
- . la structure des cellules des semences étudiées

3°) l'étude des systèmes enzymatiques susceptibles d'intervenir dans la dégradation et l'utilisation des glucomannanes au cours de la germination, en abordant plus précisément les points suivants:

- . l'étude " in vitro " des mécanismes de dégradation des glucomannanes
- . l'évolution, au cours de la germination, des systèmes enzymatiques susceptibles d'intervenir dans la dégradation des glucomannanes
- . l'étude des mécanismes pouvant intervenir " in vivo " dans la dégradation et l'utilisation des polysaccharides au cours de la germination des graines d'asperge.

En conclusion de ce travail, il nous est possible de proposer un schéma des différentes combinaisons contenant du mannose qui peuvent être rencontrées au cours de la maturation et de la germination des graines de Liliacées ainsi que les modalités de leurs transformations. La localisation de ces processus à l'intérieur des organes de la semence est également décrite.

P R E M I E R E P A R T I E

ETUDE DES COMPOSES A MANNOSE CONTENUS DANS LES SEMENCES DE
CERTAINES LILIACEES

La recherche de mannose, à l'état libre ou combiné, dans les graines de diverses Liliacées nous a permis de mettre en évidence la présence d'importantes quantités d'hémicelluloses renfermant du mannose. Ces composés ont été extraits et purifiés, afin de déterminer leur composition chimique et leur structure. Enfin, la localisation de ces polysaccharides dans les cellules des graines a été étudiée.

A) Recherche du mannose et des composés à mannose dans les graines de certaines Liliacées.

Les graines de quatre espèces de Liliacées ont été étudiées: Allium cepa, Allium porum, Asparagus Officinalis et Endymion nutans. Les semences de Jacinthe des bois ont été récoltées à maturité dans les sous-bois de la Faculté des Sciences d'Orsay. Les autres graines sont de provenance commerciale. (Asperge: Etablissements Clause; Oignon, Poireau: Etablissements Vilmorin). Les semences non germées, broyées finement, sont stabilisées dans l'alcool à 96° bouillant. Les fractions glucidiques suivantes ont été extraites et étudiées:

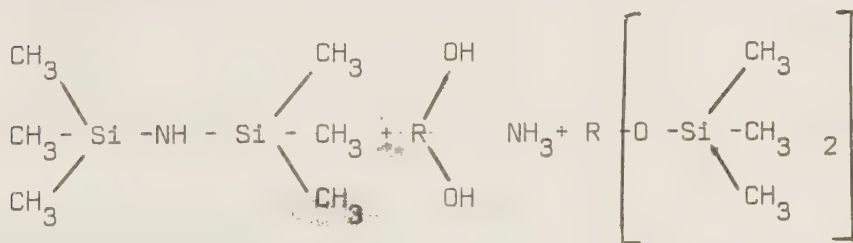
- les glucides " solubles " dans les solutions hydroalcooliques à 80 et 60°;
- les polysaccharides hydrosolubles, en étudiant séparément les glucides entraînés par l'eau froide et les glucides entraînés par l'eau bouillante.
- les " hémicelluloses ": sont classés dans cette catégorie les glucides insolubles dans l'eau et hydrolysables par l'acide chlorhydrique ou sulfurique 3N.

1°) Etude des glucides "solubles"

Les extraits hydroalcooliques sont concentrés, passés sur des résines échangeuses d'ions (résine cationique: Dowex 50 puis résine anionique Amberlite IR 45) et amenés à un volume déterminé. Les glucides sont alors étudiés quantitativement et qualitativement. La teneur en sucres réducteurs, avant et après hydrolyse acide (HCL N 20 mn à 100°), est déterminée par dosage selon la technique de Nelson-Somogyi (77) La composition des solutions est précisée par l'analyse en chromatographie descendante sur papier Whatmann N° 1 (40h dans le solvant butanol - acide acétique - eau 5-1-2; révélateur: phosphate de para-anisidine (74)). Dans certains cas, les différents oligosides sont élués (2 traitements de 30 mn chacun par l'alcool à 50° bouillant puis 2 traitements de 30 mn par l'eau à l'ébullition) hydrolysés et leur composition déterminée par chromatographie en phase gazeuse afin de rechercher la présence éventuelle de mannose. Cette dernière technique a été utilisée en permanence tout au long de ce travail, aussi les conditions expérimentales doivent être ici décrites en détail.

a) Analyse des mélanges glucidiques par chromatographie en phase gazeuse.

En 1963, Sweeley (105) a montré que les dérivés triméthylsilyls des hexoses et pentoses peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse. Ces dérivés sont obtenus de la manière suivante: les solutions glucidiques sont évaporées et les oses repris par la pyridine puis silylés par l'hexaméthylidisilazane en présence de triméthylchlorosilane suivant la réaction:



hexaméthylidisilazane

glucide

glucide silylé

La pyridine est alors éliminée par concentration sous pression réduite et les oses silylés repris par quelques gouttes de sulfure de carbone. Toutes les analyses ont été faites avec un appareil "Aerograph 204 " à détecteur à ionisation de flamme le débit d'hydrogène était de 20 ml/mn; l'azote, gaz porteur; était fourni sous une pression de 0,8kg. Les séparations ont été réalisées soit à température constante, soit en programmation de température.

Chromatographie à température constante: Les conditions de

Sawardeker et Slonecker (96) ont été légèrement modifiées.

- colonne " inox " de 304 cm de long et 3mm de diamètre
- phase stationnaire : carbowax 20M -- 15% gaschrom Z - 100-120 mesh
- température de la colonne : 155°
de l'injecteur: 180°
du détecteur : 220°

Au cours de ce travail, les points techniques suivants ont pu être précisés:

- . L'importance de la température de conditionnement de la phase stationnaire: les temps de rétention des différents isomères dépendent de la température de conditionnement. Généralement, la phase est conditionnée 20.25° au-dessus de la température utilisée pour la séparation (soit environ 180°) Or, si le conditionnement est effectué à 200°, la séparation obtenue est bien meilleure (fig.1A et B).
- . L'importance de " l'âge " des solutions: le rapport des formes α et β des différents oses évolue avec "l'âge " des solutions (fig.2A et B) Ce fait a d'ailleurs été constaté depuis par Lee et ses collaborateurs (64). Il importe donc de travailler dans des conditions très constantes.
- . La chromatographie en phase gazeuse permet d'analyser qualitativement et quantitativement divers mélanges glucidiques à condition d'y ajouter des quantités déterminées d'un " témoin interne " l' α méthyl-mannose. La " réponse " du détecteur est préalablement "calibrée " à l'aide de solutions témoins d'oses injectés en quantité variable par rapport à l'étalon interne " (fig.3) Sont ainsi déterminés (tabl.1):

Tableau 1:- Temps de rétention (t) et facteur correctif (k)
des différents oses séparés à 155° sur une colonne
de Carbowax 20 M.

t: rapport entre le temps de rétention de chaque ose et celui de l' α méthyl-mannose.

k: aires des pics des divers isomères d'un même ose/aire du pic d' α méthyl-mannose (lorsque le mélange analysé contient des quantités égales de ces deux composés.)

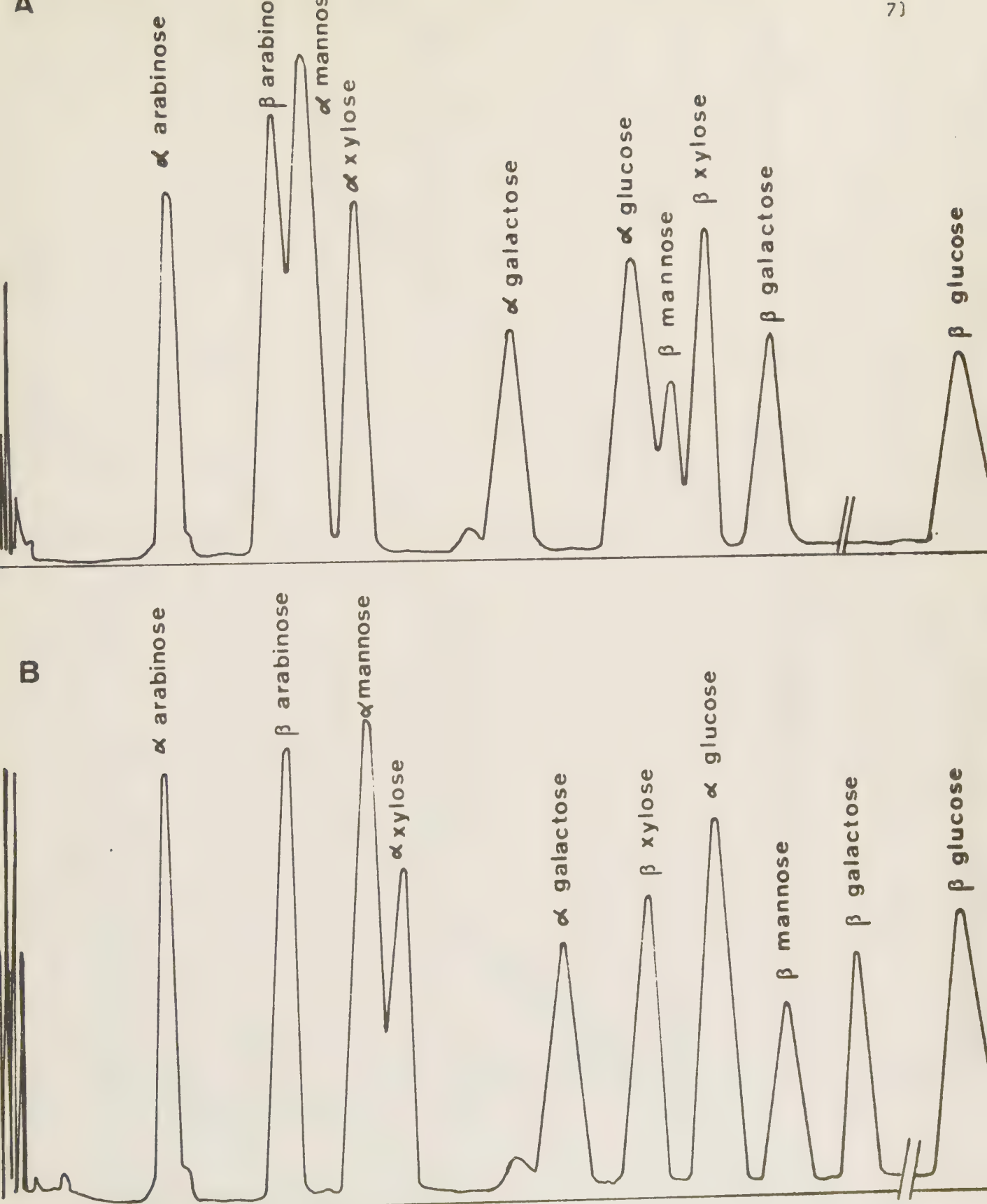


Fig. 1 : Chromatographie d'un mélange d'oses témoins.

A : phase stationnaire conditionnée à 180°.

B : phase stationnaire conditionnée à 200°.

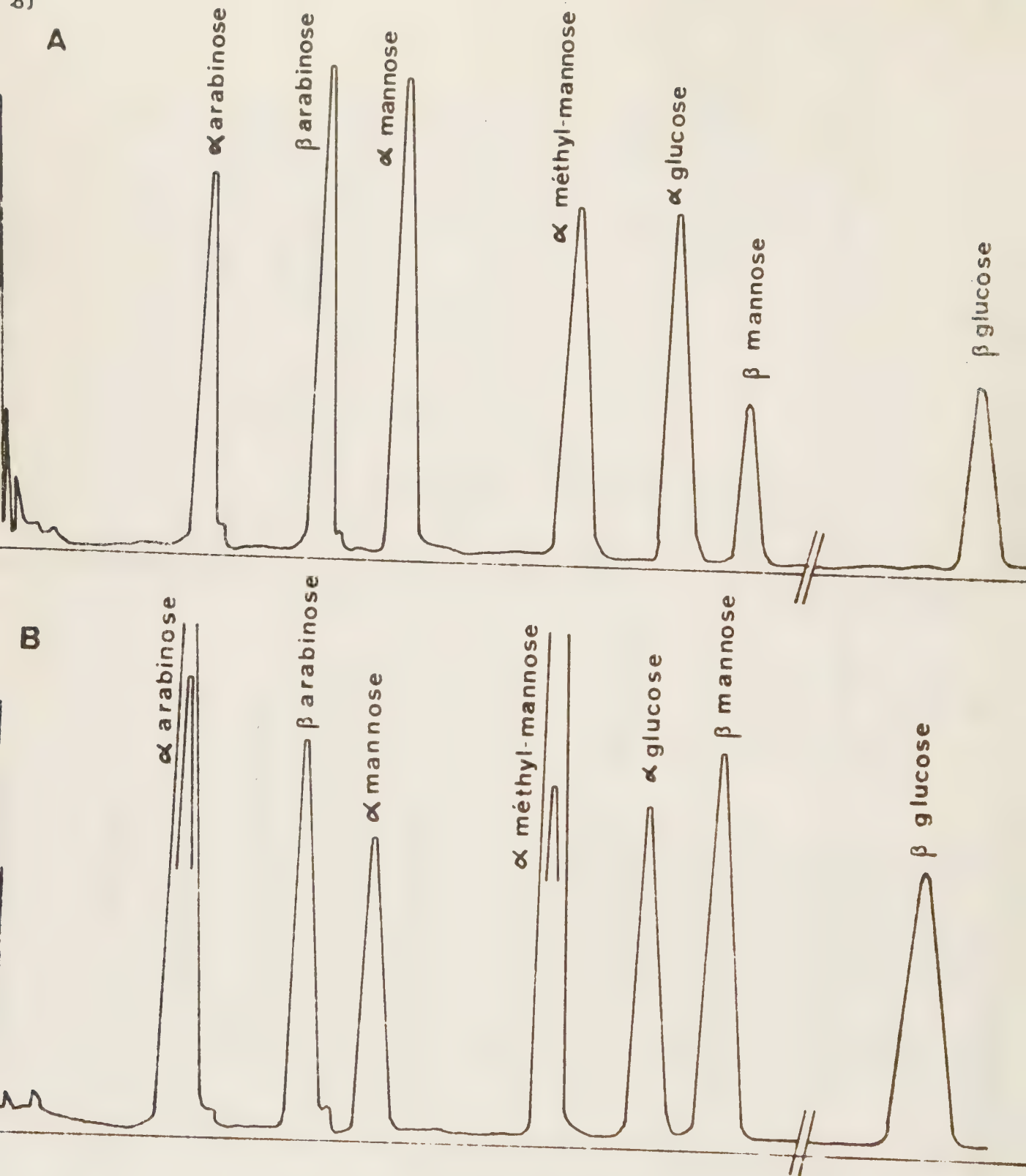


Fig. 2 : Chromatographie d'un mélange d'oses témoins.

A : la silylation est effectuée 10' après la préparation des solutions témoins.

B : La silylation est effectuée 24 h après la préparation des solutions témoins.

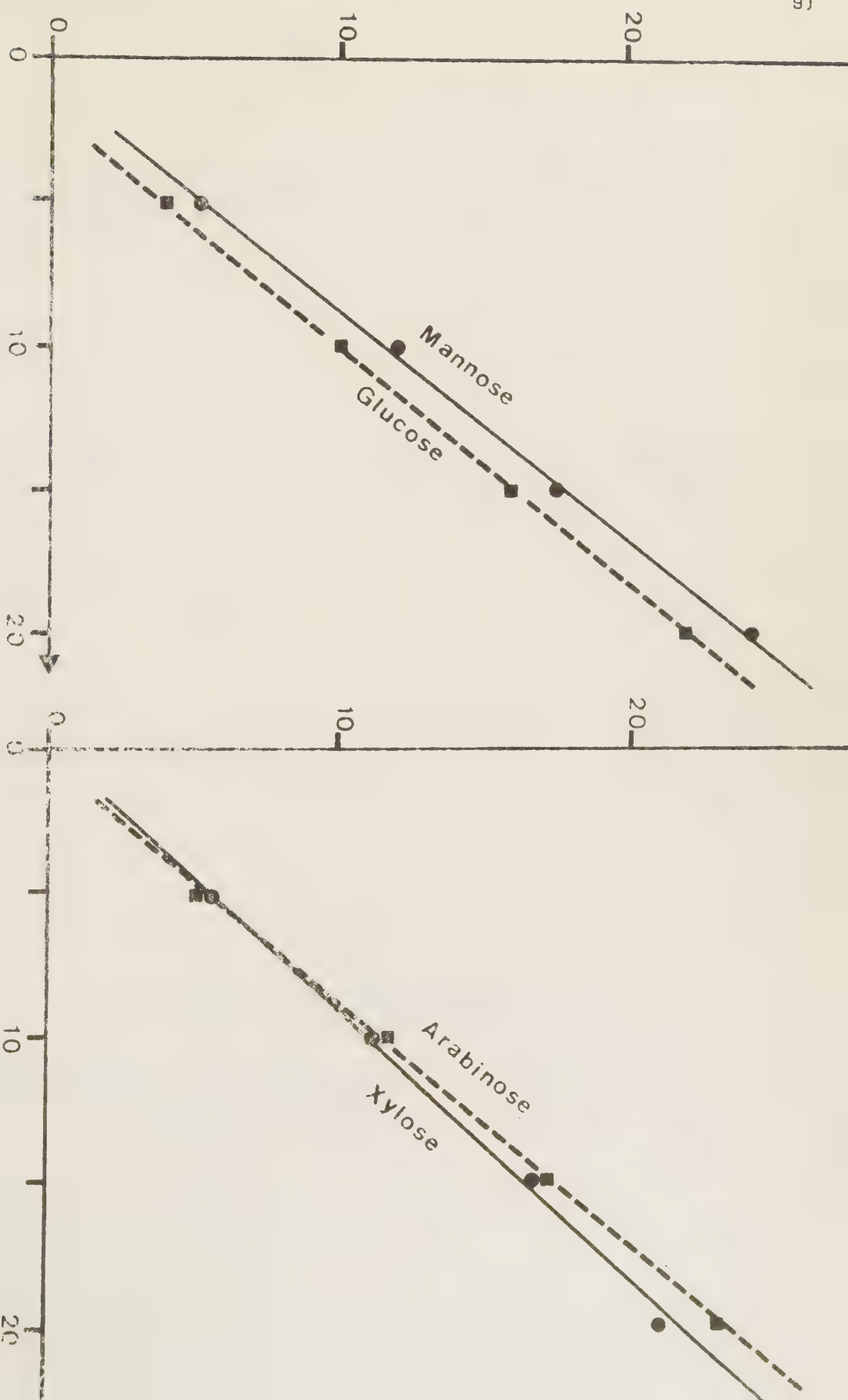


Fig. 3 : Etalonnage de la réponse du réacteur par des solutions glucidiques de concentration constante.

en abscisses : concentration de l'échantillon (en mg).

et ordonnées : aire du pic/aire du pic d'étalon (47.6) pour une concentration de 250 mg/l.

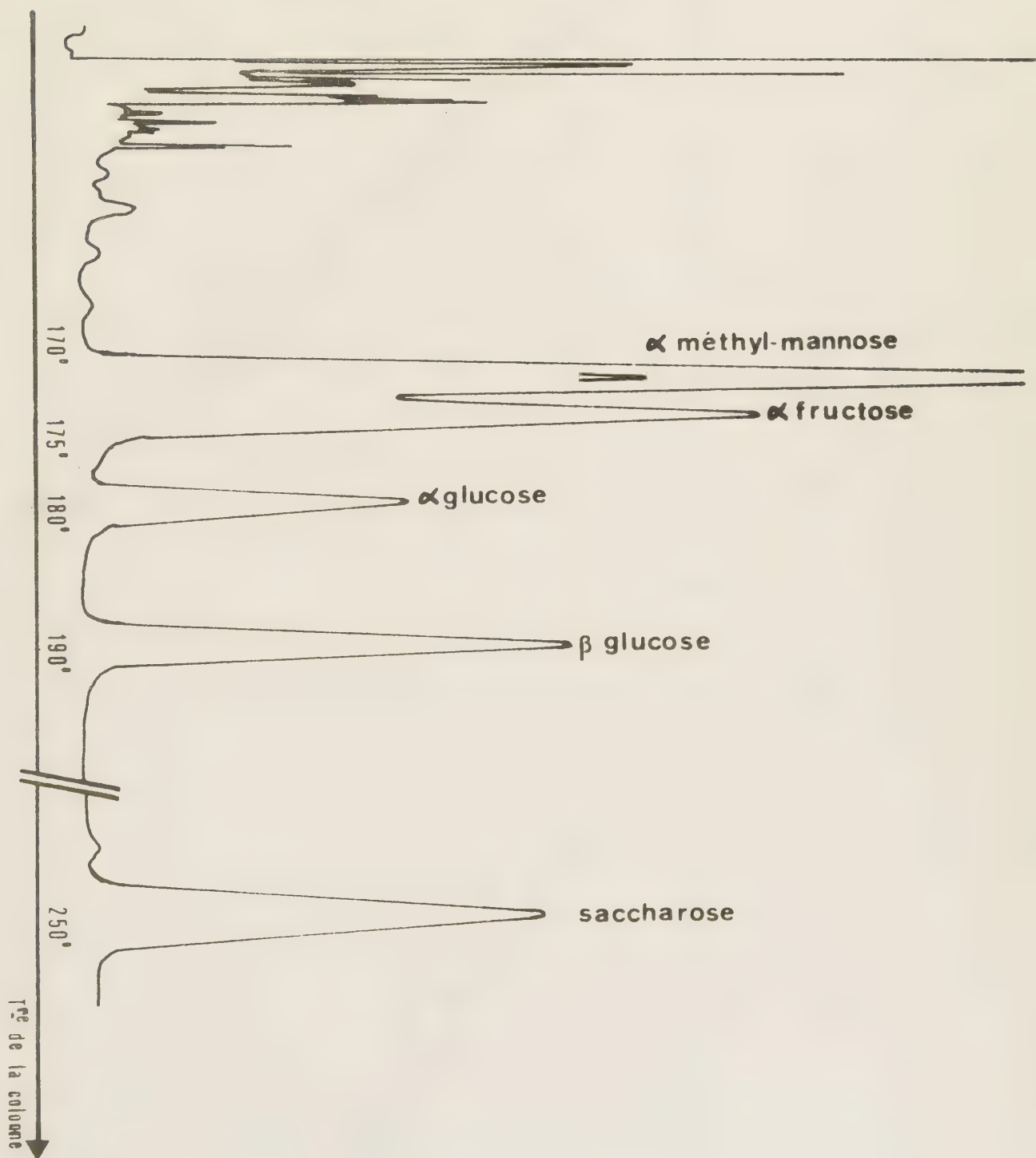
	Temps de rétention		Facteur correctif k	
	Colonne conditionnée à 180°	Conditionnement à 200°	Conditionnement à 180°	Conditionnement à 200°
binose	0,40 0,59	0,38 0,56	1,45	1,12
ose	0,75 1,16	0,71 1,12	1,17	1,09
nose	0,69 1,17	0,68 1,42	1,28	1,16
cose	1,09 2,13	1,18 2,39	0,92	0,97
actose	0,88 1,30	0,98 1,50	0,90	1,02

- les temps de rétention des différents isomères par rapport à 1 α méthyl-mannose;
- les facteurs correctifs de chaque ose, facteurs correctifs k obtenus par la formule suivante:

$$k = \frac{\text{aires des formes } \alpha \text{ et } \beta \text{ d'un ose}}{\text{aire de 1} \alpha \text{ méthyl-mannose}}$$

lorsque le mélange contient la même quantité d'ose et d' α méthyl-mannose, l'aire est équivalente au produit: hauteur du pic X largeur du pic à mi-hauteur.

Fig. 4 : Chromatographie d'un mélange de glucides témoins en programmation de température.



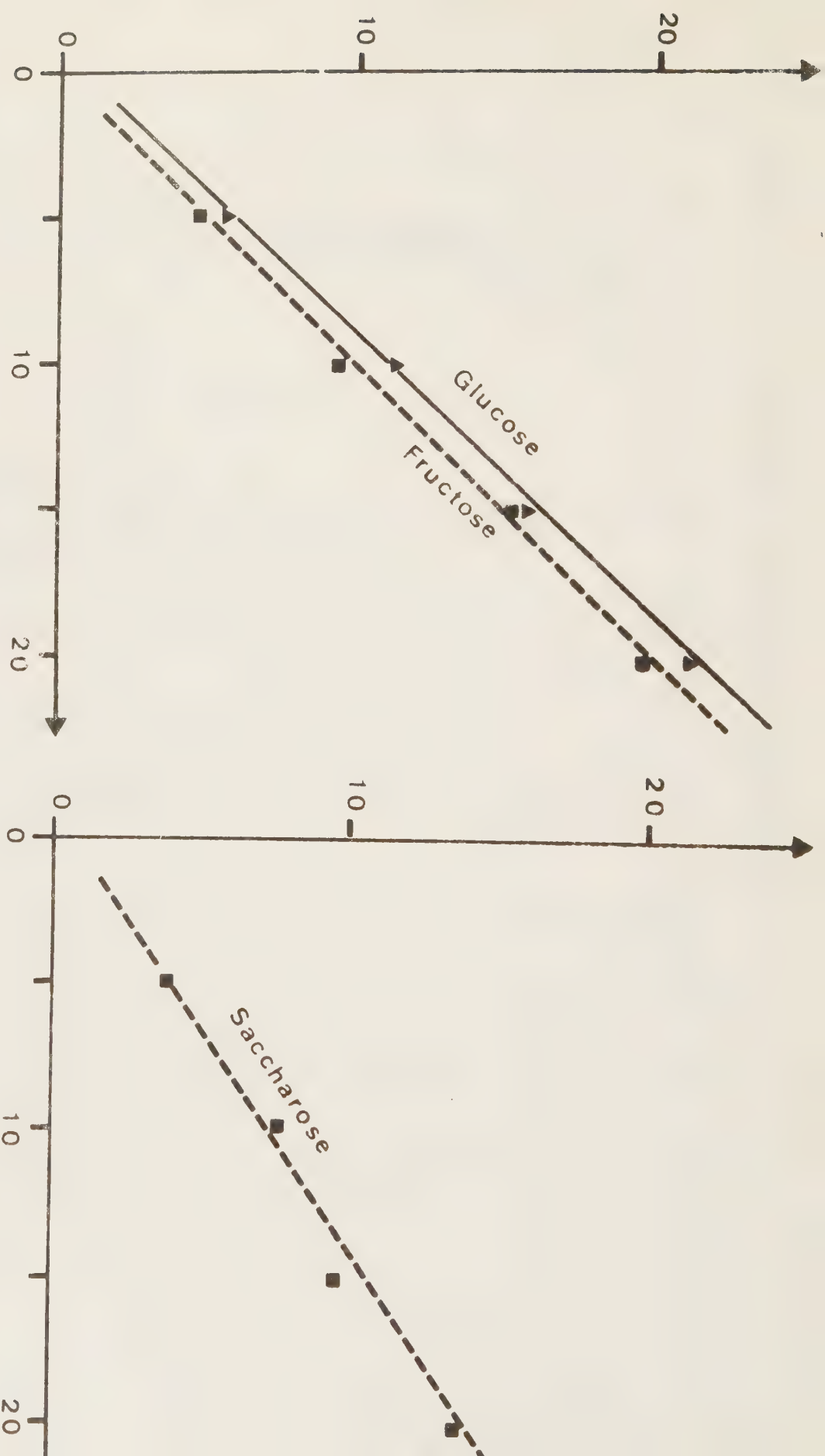
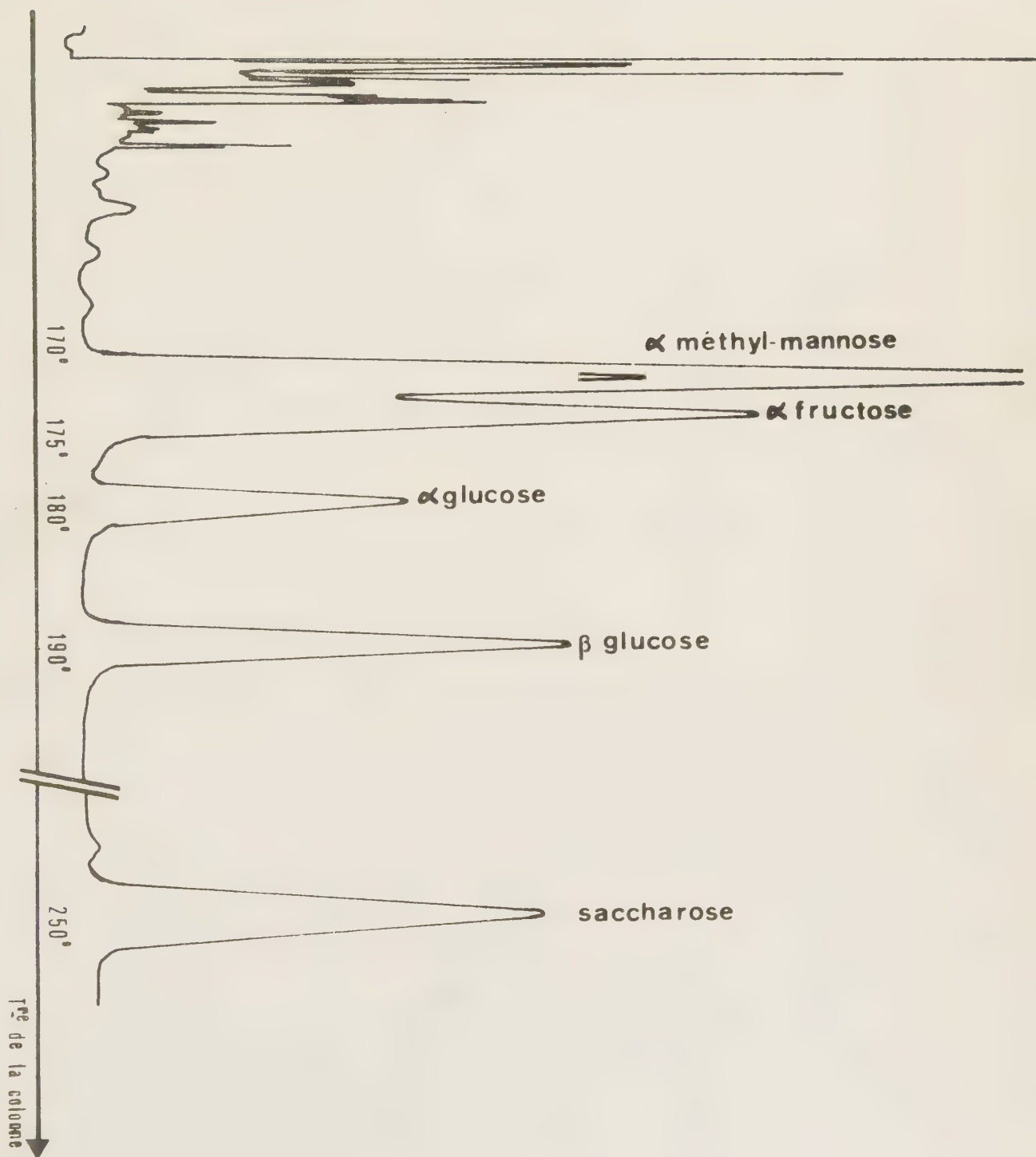


Fig. 5 : Etalonnage de la réponse du détecteur en programmation de mV .

- en abscisses : concentration de l'échantillon (en mg).
- en ordonnées : aire du pic/aire du pic d' α -méthylmannose (la concentration de l' α -méthylmannose demeurant constante).

Fig. 4 : Chromatographie d'un mélange de glucides témoins en programmation de température.



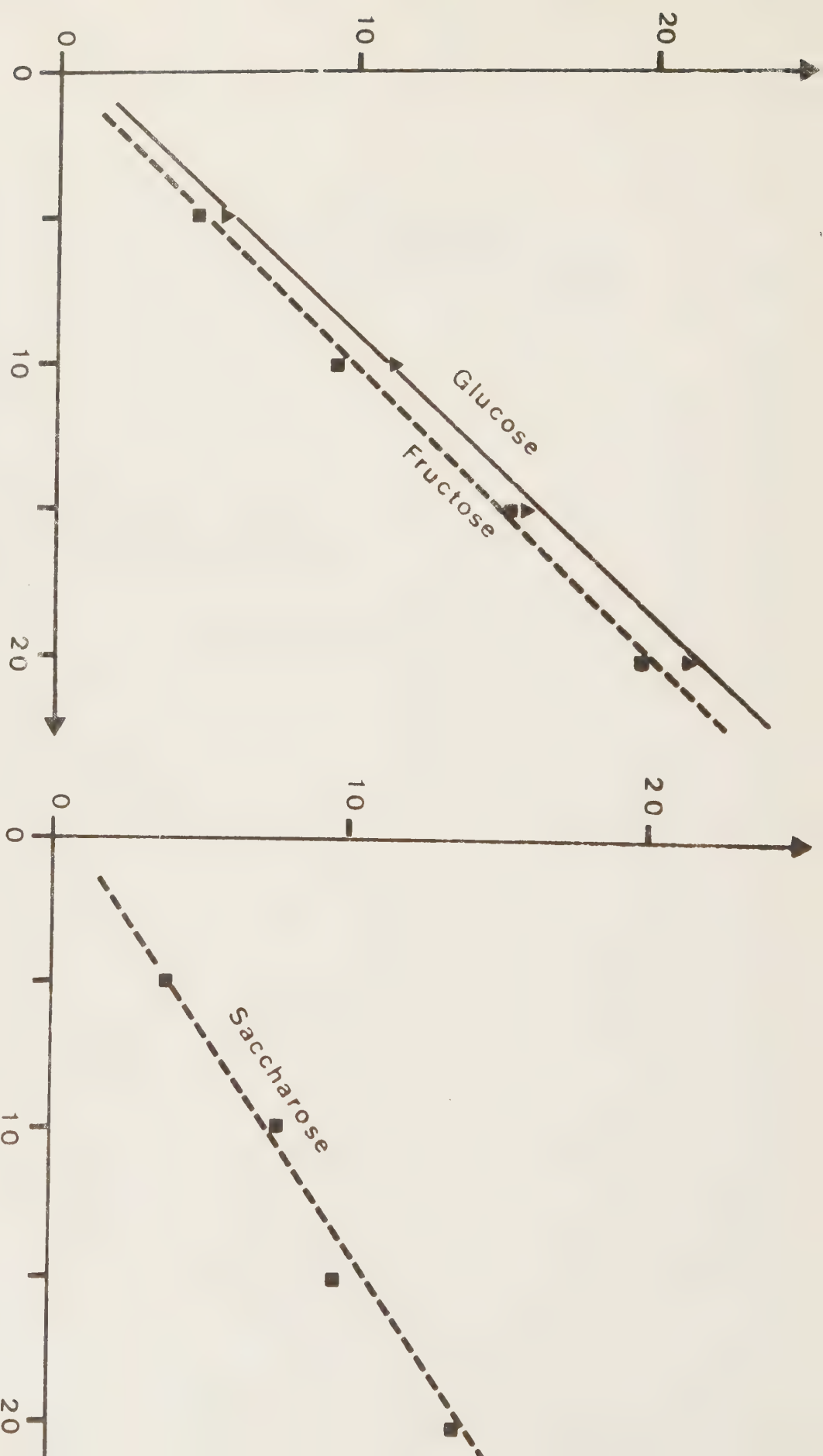


Fig. 5 : Etalonnage de la réponse du détecteur en programmation de t_{pe}.

- en abscisses : concentration de l'échantillon (en mg).
 - en ordonnées : aire du pic/aire du pic d' α -méthylmannose (la concentration de l' α -méthylmannose demeurant constante).

- Chromatographie avec programmation de température:

Les conditions expérimentales sont les suivantes:

- colonne de 152 cm de long et 3 mm de diamètre
- phase stationnaire: SE 30 - 5% chromosorb.
- température: colonne 150° au départ; augmentation de 2°/mn

détecteur: 275°

injecteur: 200°

Cette technique permet de séparer le glucose, le fructose et la saccharose (fig.4) Après étalonnage de la réponse du détecteur (fig.5), l'utilisation des mélanges contenant une quantité connue d' α méthyl-mannose permet de déterminer les quantités de glucides présents dans le mélange.

Soit q_{mg} la quantité d' α méthyl-mannose, la quantité x_{mg} d'un ose de la solution sera alors égale à:

$$x_{mg} = \frac{\int \text{des aires des formes } \alpha \text{ et } \beta \text{ d'un ose}}{k \times q}$$

b) Composition des fractions hydroalcooliques .

Les graines des quatre espèces étudiées sont très pauvres en sucres réducteurs libres et contiennent de faibles quantités de glucides combinés (tableau 2). Dans tous les cas, les chromatographies sur papier révèlent (révélateurs à l'urée ou au phosphate de p. anisidine) la présence de traces de glucose et de fructose, de saccharose et d'une série d'oligosides renfermant du fructose dans leur molécule (fig.6). La composition des oligosides est analysée: après hydrolyse acide des solutions hydroalcooliques, la nature des oses libérés dans le milieu est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Des quantités relativement importantes de rhamnose ($\approx 10\%$) ont ainsi été mises en évidence dans les graines de Jacinthe. Les solutions hydroalcooliques renferment de plus des traces de mannose et d'arabinose. Le galactose est très rare dans les graines d'Asperge: les oligosides sont vraisemblablement des oligofructosides; une confirmation de cette hypothèse est apportée par l'analyse de ces oligosides. Ces composés sont séparés par chromatographie sur papier, élués, hydrolysés, silylés puis étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

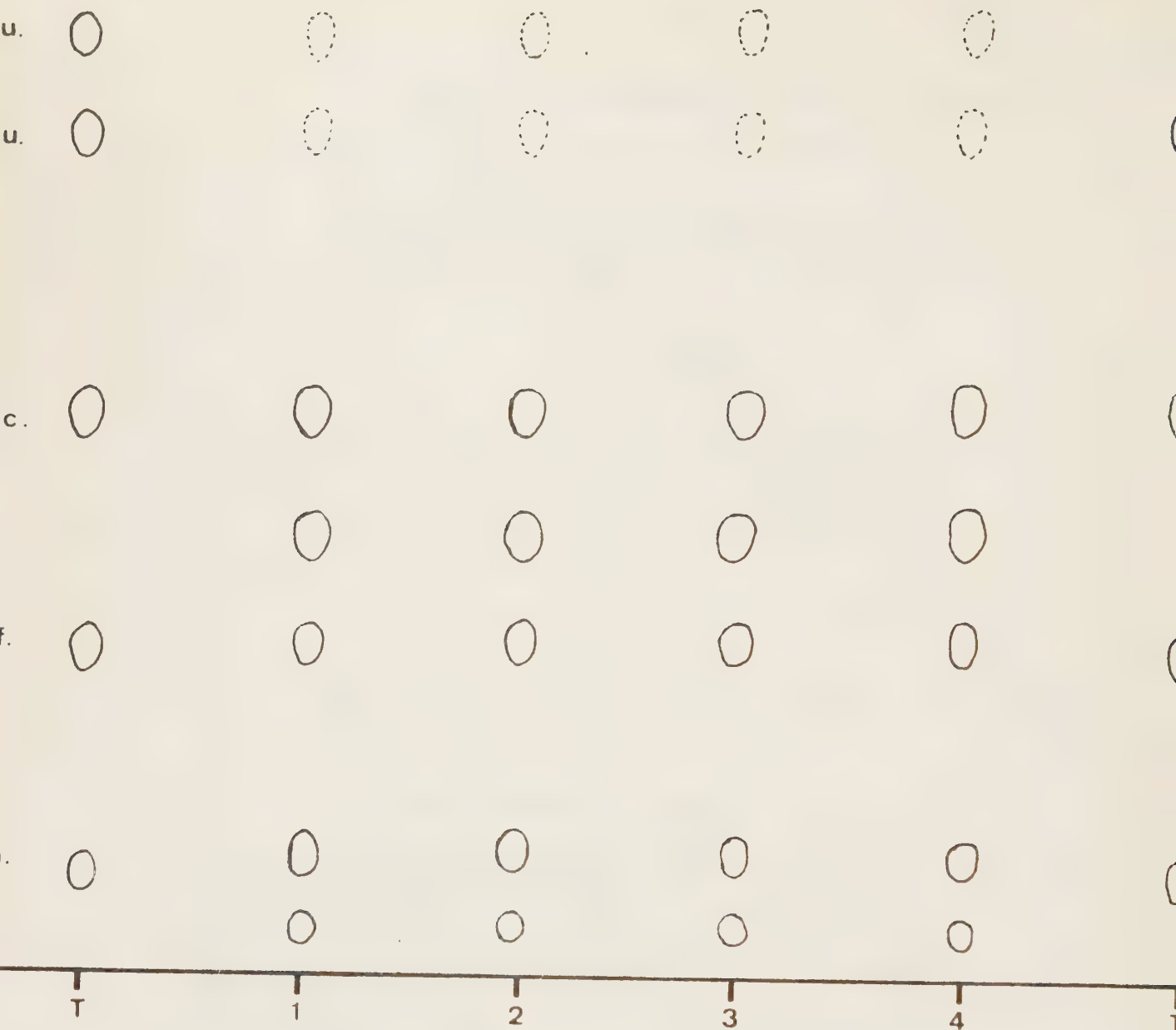


Fig. 6 : Chromatographie des extraits hydroalcooliques des graines de quelques Liliacées.

- T. mélange de glucides témoins.
- 1. Extraits des graines d'*Allium cepa*.
- 2. Extraits des graines d'*Allium porum*.
- 3. Extraits des graines d'*Endymion nutans*.
- 4. Extraits des graines d'*Asparagus officinalis*.

Fru= fructose.
 Glu= glucose.
 Sac= saccharose.
 Raf= raffinose.
 Sta= stachyose.

Tableau 2:- Importance des diverses fractions glucidiques
dans les graines de quelques Liliacées.

Les résultats sont exprimés en mg de substances réductrices libérées après hydrolyse acide et rapportés, suivant les cas, à une graine, 100 g de substance sèche (m.s) ou 100 mg de substances insolubles (dans l'eau)

Graine étudiée	Allium cepa	Allium porum	Endymion nutans	Asparagus officinalis
<u>A. Sucres solubles</u>				
mg/graine	0,095	0,084	0,097	0,59
mg/100mg m.s	2,94	3,36	2,7	3,53
<u>B. Polysaccharides solubles</u> <u>dans H2O froide.</u>				
mg/graine	0,0016	0,0024	0,020	0,0030
mg/100mg m.s	0,051	0,095	0,60	0,18
<u>C. Polysaccharides solubles</u> <u>dans H2O chaude.</u>				
mg/graine	0,0027	0,0026	0,0068	0,0037
mg/100 mg m.s	0,084	0,10	0,19	0,22
<u>D. Hémicelluloses---</u>				
mg/graine	0,87	0,90	1,68	7,33
mg/ 100 mg m.s	27,17	35,87	47,1	43,8
mg/ 100 mg insol.	32,3	40	58	57,4

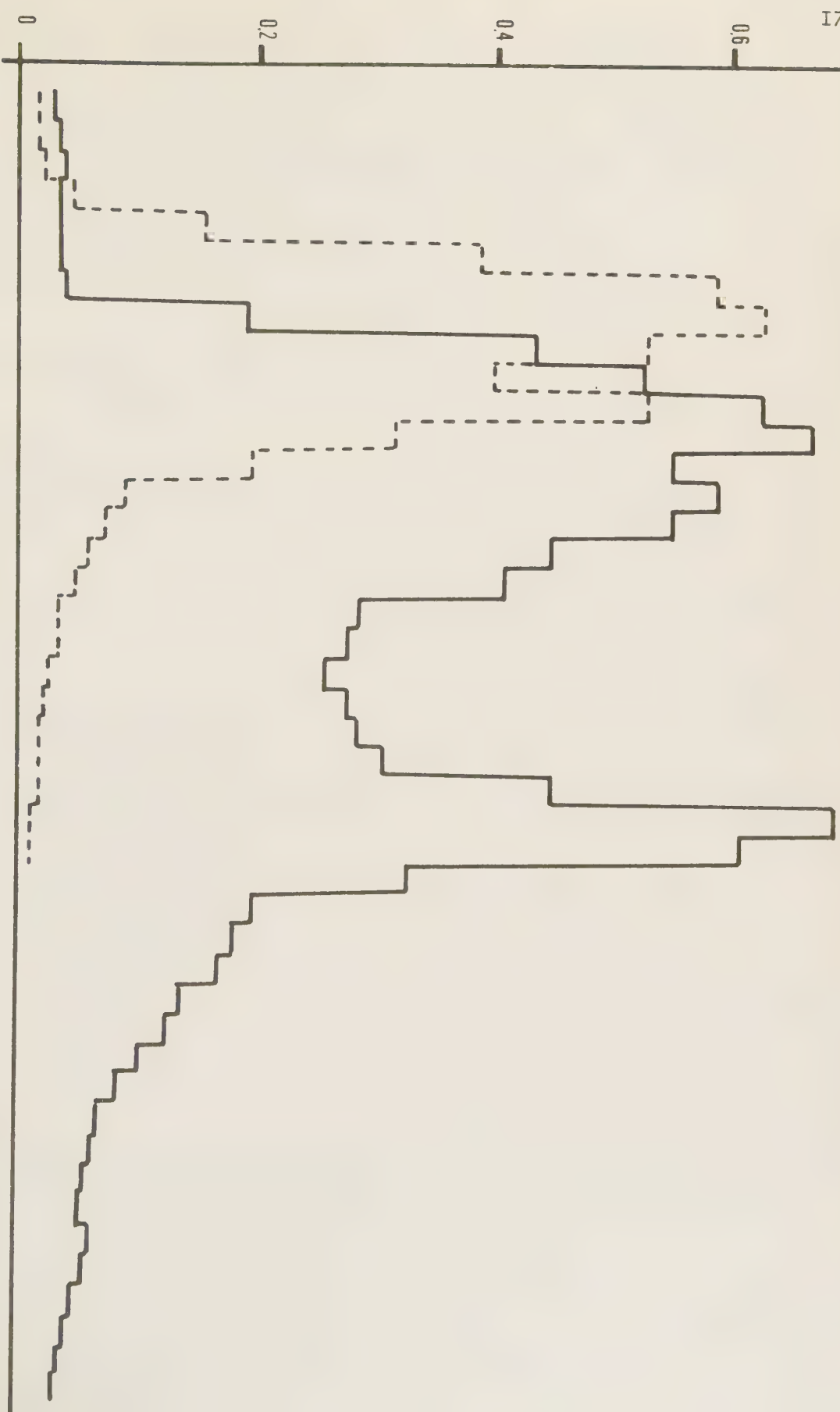
Ce procédé permet de constater que le glucide migrant juste en-dessous du saccharose lors des chromatographies sur papier ne contient que du fructose et du glucose (le rapport fructose sur glucose étant égal à 2); les autres oligosides montrent la même composition chimique et un rapport fructose sur glucose = 2, dont la valeur croit avec la masse moléculaire du composé. Bacon (9) avait déjà rapporté la présence de semblables séries d'oligofructosides dans les organes végétatifs de diverses Monocotylédones.

2°) Etude des polysaccharides entraînaibles par l'eau.

Après les extractions par les solutions hydroalcooliques, les graines broyées sont traitées successivement par l'eau froide (24h) et par l'eau bouillante (2 extractions de 2 h) chacune). Les teneurs en glucides des fractions aqueuses ainsi obtenues sont estimées après hydrolyse acide (HCl N - 1h. à 100° C) et la nature des oses libérés déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Les fractions aqueuses, extraites des graines d'Asperge et de Jacinthe, subissent en plus une précipitation par l'alcool (3/1 en volume) qui précipite les macromolécules; les précipités sont lyophilisés puis analysés ainsi que les surnageants: détermination de la teneur en substances réductrices et de leur nature, ainsi que de leur teneur en azote (la quantité d'azote est évaluée colorimétriquement après minéralisation selon la méthode de Koch et Mc Meeckin (60)). Enfin, ces diverses fractions sont filtrées sur gel Séphadex afin d'estimer leur homogénéité (colonne de 100 cm de hauteur et 0,5 cm de diamètre; élution par de l'eau désionisée et dosage des glucides par le réactif à l'anthrone (30)).

Les graines étudiées ne renferment que très peu de composés glucidiques entraînaibles par l'eau (tableau 2). Ce procédé d'extraction permet d'obtenir des substances de composition très hétérogènes contenant des quantités relativement importantes de mannose (tableaux 3 et 4). Les surnageants obtenus après l'addition d'alcool sont constitués par un ensemble de polymères glucidiques (fig.7) qui peuvent être séparés par filtration sur gel Séphadex. Les précipités contiennent des molécules plus grosses (PM > 75000) et plus homogènes (fig.7). Le mannose se retrouve surtout dans les polysaccharides de PM élevé (tableau 4).

0.0. a 650 nm.
après action du réactif à l'anthrone



fractions glucidiques éluées

Fig. 7: Tamisage moléculaire sur-gel Séphadex des fractions hydrosolublesextraites des graines d'asperge.

— : fraction B_T, gel G 15.

--- : fraction G 15, gel G 75.

Tableau 3 - Composition des polysaccharides des graines d'*Allium cepa* et d'*Allium porum*.

A. Glucides insolubles dans les solutions hydro-alcooliques, mais entraînables par l'eau froide.

B. Glucides entraînables par l'eau bouillante après le traitement précédent.

C. "Hémicelluloses" (fraction glucidique non entraînée après l'ensemble des traitements précédents)

Les résultats expriment les pourcentages des différents oses constitutifs des diverses fractions glucidiques.

gl = glucose

xy = xylose

Ma = mannose

ar = arabinose

gal = galactose

	A					B					C				
	gl	Ma	Gal	Xyl	Ar	gl	Ma	gal	xy	Ar	gl	Ma	gal	xy	Ar
- <i>Allium porum</i>	38	25	25	3	9	32	32	20	2	14	41	54	5	-	-
- <i>Allium cepa</i>	29	29	25	4	13	37	17	25	8	13	39	57	4	-	-

Tableau 4 - Composition des polysaccharides des graines
d'Asparagus officinalis et d'Endymion nutans.

Les résultats expriment les pourcentages des différents oses constitutifs des diverses fractions glucidiques.

1) Fractions entraînables par l'eau.

A) fraction extraite par l'eau froide

B) fraction extraite par l'eau chaude

A_1B_1 : fractions ne précipitant pas en solution hydro-alcoolique.

A_2B_2 : fractions précipitant en solution hydroalcoolique.

	Asparagus				Endymion			
	A		B		A		B	
	A1	A2	B1	B2	A1	A2	B1	B2
- Teneur en azote (en mg pour 100 mg de la fraction)	1,3	10	7,2	7,2	0,52	3,05	5,3	6,2
- Teneur en substances réductrices. (en mg pour 100 mg de la fraction)	10,6	65	6,5	42,5	3,2	37,5	6,18	38,0
- Composition en oses (en mg pour 100 mg d'oses libérés après hydrolyse acide)								
- glucose	80	44	40	22	59	46	58	47
- mannose	7	26	9	45	16	40	30	44
- galactose	7	18	6	19	7	10	6	8
- arabinose	4	5	39	8	14	3	4	1
- xylose	2	6	6	6	4	-	2	-

2) "Hémicelluloses" = fraction glucidique non entraînée par les traitements précédents et hydrolysable après trois heures à 100° dans une solution d'acide chlorhydrique 3 N.

Graine étudiée	Asperge	Jacinthe
Composition en oses de la fraction "hémicelluloses "		
- glucose	48	44
- mannose	51	55
	1	1

3°) Etude des substances insolubles après les extractions précédentes.

Ces substances représentent jusqu'à 76% de la matière sèche des graines. L'hydrolyse acide de cet " insoluble " (HCL 3N - 3h à 100°) permet d'obtenir des quantités plus ou moins importantes de sucres réducteurs (tableau 2). Dans tous les cas, les oses constitutifs prépondérants sont le glucose et le mannose (tableau 3)

Les graines étudiées renferment donc toutes d'importantes quantités de polymères glucidiques insolubles dans l'alcool et l'eau; ces " hémicelluloses " contiennent essentiellement du glucose et du mannose. Nous avons tenté d'extraire, de purifier et d'analyser ces polysaccharides.

B) Etude des polysaccharides à mannose des graines de trois espèces de Liliacées : Asparagus officinalis, Endymion nutans, Allium cepa.

1) Asparagus officinalis

1°) Techniques d'extraction.

Une série d'extractions successives entraîne l'élimination des glucides solubles dans l'alcool, de ceux entraînables par l'eau froide et enfin de ceux extraits par l'eau bouillante. A partir de l'"insoluble résiduel", diverses fractions différant par leur solubilité dans la soude et leur degré de purification ont été séparées. Certaines modifications ont été apportées aux techniques d'isolement utilisées par Le Dizet lors de son étude des mannanes des graines de Dattes (65).

Comme le montre le tableau 5, l'"insoluble " subit successivement:

- ,1 extraction de 24h par la soude 2N
- 1 extraction de 48h par la soude 2N
- 1 extraction de 48h par la soude 5N
- 1 extraction de 120h par la soude 5N
- 1 extraction de 72h par la soude 5N

Chacune des solutions sodiques ainsi obtenues (A.B.C.D.E.) subit alors le traitement suivant: neutralisation par l'acide acétique, précipitation par l'alcool et dialyse du précipité " contre " de l'eau déminéralisée (24h). Après centrifugation une partie du précipité est congelée dans l'azote liquide et lyophilisée (A1.B1.C1.D1.E1) le reste est redissous dans la soude et précipité par la liqueur de Fehling (7) (En effet, le cuivre en solution alcaline forme des complexes insolubles avec certains polysaccharides); après centrifugation, le précipité bleu est traité par HCl glacé afin d'éliminer le cuivre; une partie du précipité décoloré se dissout progressivement sous l'action de l'acide chlorhydrique; la solution

chlorhydrique est précipitée par l'alcool, le précipité est dialysé jusqu'à élimination de l'HCl, congelé dans l'azote liquide et lyophilisé (A2.B2.C2.D2.E2). Le précipité incolore qui subsistait après addition d'HCl est également dialysé, congelé et lyophilisé (A'2.B'2.C'2.D'2.E'2). Les diverses fractions, ainsi obtenues, ainsi que l'insoluble restant après les extractions sodiques, sont alors analysés.

2°) Etude de la composition chimique des différentes fractions obtenues par les extractions sodiques.(35)

Afin de déterminer la pureté de ces fractions, la présence d'azote est recherchée après minéralisation d'une partie aliquote de chacune des poudres (environ 20 mg); l'azote minéral est alors dosé par le réactif de Nessler modifié suivant la méthode de Koch et Mc Meekin. Puis la teneur de chaque fraction en monosaccharides est estimée après hydrolyse acide (HCl 3N.3h à 100°) par dosage selon la technique de NELSON après neutralisation des hydrolysats. La composition des divers hydrolysats est déterminée par la chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilyls des oses. Le tableau 6 renferme les résultats de ces analyses. Les faits suivants peuvent être constatés:

- les diverses fractions (à l'exception de A1.B1.C1) sont à peu près exemptes d'azote. Dans ces trois cas, la présence d'azote est due vraisemblablement à l'entraînement de traces de protéines (les extractions aqueuses préalables ont sans doute été insuffisantes pour éliminer toutes les protéines.) De même, l'insoluble résiduel contient encore 1% d'azote.
- Il n'a pas été possible d'obtenir 100% de sucres réducteurs après hydrolyse acide; en effet, les conditions de cette hydrolyse (durée 3h - acidité 3N) provoquent une destruction non négligeable des hexoses libérés tout en étant insuffisantes pour entraîner une hydrolyse totale (un léger résidu insoluble subsiste toujours à la fin de l'hydrolyse); enfin il se pourrait que les préparations lyophilisées contiennent des substances non glucidiques.

Les variations observées entre les diverses fractions sont peut-être dues à des différences dans la granulométrie des poudres obtenues après lyophilisation, ce qui entraînerait une hydrolyse inégale.

- Toutes les fractions contiennent à peu près autant de glucose que de mannose. Seule, la fraction obtenue lors de la première extraction par la soude, et non purifiée par la liqueur de Fehling (A1) contient un peu plus de glucose que de mannose (mannose/glucose = 0,80), ce glucose supplémentaire provient peut-être de composés pectiques incomplètement éliminés lors des traitements préalables par l'eau bouillante. L'insoluble résiduel " qui subsiste après toutes les extractions sodiques libère après hydrolyse

Solutions B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, AA, AB, AC, AD, AE, AF, AG, AH, AI, AJ, AK, AL, AM, AN, AO, AP, AQ, AR, AS, AT, AU, AV, AW, AX, AY, AZ, BA, BB, BC, BD, BE, BF, BG, BH, BI, BJ, BK, BL, BM, BN, BO, BP, BQ, BR, BS, BT, BU, BV, BW, BX, BY, BZ, CA, CB, CC, CD, CE, CF, CG, CH, CI, CJ, CK, CL, CM, CN, CO, CP, CQ, CR, CS, CT, CU, CV, CW, CX, CY, CZ, DA, DB, DC, DD, DE, DF, DG, DH, DI, DJ, DK, DL, DM, DN, DO, DP, DQ, DR, DS, DT, DU, DV, DW, DX, DY, DZ, EA, EB, EC, ED, EE, EF, EG, EH, EI, EJ, EK, EL, EM, EN, EO, EP, EQ, ER, ES, ET, EU, EV, EW, EX, EY, EZ, FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG, FH, FI, FJ, FK, FL, FM, FN, FO, FP, FQ, FR, FS, FT, FU, FV, FW, FX, FY, FZ, GA, GB, GC, GD, GE, GF, GG, GH, GI, GJ, GK, GL, GM, GN, GO, GP, GQ, GR, GS, GT, GU, GV, GW, GX, GY, GZ, HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG, HH, HI, HJ, HK, HL, HM, HN, HO, HP, HQ, HR, HS, HT, HU, HV, HW, HX, HY, HZ, IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH, II, IJ, IK, IL, IM, IN, IO, IP, IQ, IR, IS, IT, IU, IV, IW, IX, IY, IZ, JA, JB, JC, JD, JE, JF, JG, JH, JI, JJ, JK, JL, JM, JN, JO, JP, JQ, JR, JS, JT, JU, JV, JW, JX, JY, JZ, KA, KB, KC, KD, KE, KF, KG, KH, KI, KJ, KK, KL, KM, KN, KO, KP, KQ, KR, KS, KT, KU, KV, KW, KX, KY, KZ, LA, LB, LC, LD, LE, LF, LG, LH, LI, LJ, LK, LL, LM, LN, LO, LP, LQ, LR, LS, LT, LU, LV, LW, LX, LY, LZ, MA, MB, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MI, MJ, MK, ML, MM, MN, MO, MP, MQ, MR, MS, MT, MU, MV, MW, MX, MY, MZ, NA, NB, NC, ND, NE, NF, NG, NH, NI, NJ, NK, NL, NM, NN, NO, NP, NQ, NR, NS, NT, NU, NV, NW, NX, NY, NZ, OA, OB, OC, OD, OE, OF, OG, OH, OI, OJ, OK, OL, OM, ON, OO, OP, OQ, OR, OS, OT, OU, OV, OW, OX, OY, OZ, PA, PB, PC, PD, PE, PF, PG, PH, PI, PJ, PK, PL, PM, PN, PO, PP, PQ, PR, PS, PT, PU, PV, PW, PX, PY, PZ, QA, QB, QC, QD, QE, QF, QG, QH, QI, QJ, QK, QL, QM, QN, QO, QP, QQ, QR, QS, QT, QU, QV, QW, QX, QY, QZ, RA, RB, RC, RD, RE, RF, RG, RH, RI, RJ, RK, RL, RM, RN, RO, RP, RQ, RR, RS, RT, RU, RV, RW, RX, RY, RZ, SA, SB, SC, SD, SE, SF, SG, SH, SI, SJ, SK, SL, SM, SN, SO, SP, SQ, SR, SS, ST, SU, SV, SW, SX, SY, SZ, TA, TB, TC, TD, TE, TF, TG, TH, TI, TJ, TK, TL, TM, TN, TO, TP, TQ, TR, TS, TT, TU, TV, TW, TX, TY, TZ, UA, UB, UC, UD, UE, UF, UG, UH, UI, UJ, UK, UL, UM, UN, UO, UP, UQ, UR, US, UT, UU, UV, UW, UX, UY, UZ, VA, VB, VC, VD, VE, VF, VG, VH, VI, VJ, VK, VL, VM, VN, VO, VP, VQ, VR, VS, VT, VU, VV, VW, VX, VY, VZ, WA, WB, WC, WD, WE, WF, WG, WH, WI, WJ, WK, WL, WM, WN, WO, WP, WQ, WR, WS, WT, WU, WV, WW, WX, WY, WZ, XA, XB, XC, XD, XE, XF, XG, XH, XI, XJ, XK, XL, XM, XN, XO, XP, XQ, XR, XS, XT, XU, XV, XW, XX, XY, XZ, YA, YB, YC, YD, YE, YF, YG, YH, YI, YJ, YK, YL, YM, YN, YO, YP, YQ, YR, YS, YT, YU, YV, YW, YX, YY, YZ, ZA, ZB, ZC, ZD, ZE, ZF, ZG, ZH, ZI, ZJ, ZK, ZL, ZM, ZN, ZO, ZP, ZQ, ZR, ZS, ZT, ZU, ZV, ZW, ZX, ZY, ZZ, AA, AB, AC, AD, AE, AF, AG, AH, AI, AJ, AK, AL, AM, AN, AO, AP, AQ, AR, AS, AT, AU, AV, AW, AX, AY, AZ, BA, BB, BC, BD, BE, BF, BG, BH, BI, BJ, BK, BL, BM, BN, BO, BP, BQ, BR, BS, BT, BU, BV, BW, BX, BY, BZ, CA, CB, CC, CD, CE, CF, CG, CH, CI, CJ, CK, CL, CM, CN, CO, CP, CQ, CR, CS, CT, CU, CV, CW, CX, CY, CZ, DA, DB, DC, DD, DE, DF, DG, DH, DI, DJ, DK, DL, DM, DN, DO, DP, DQ, DR, DS, DT, DU, DV, DW, DX, DY, DZ, EA, EB, EC, ED, EE, EF, EG, EH, EI, EJ, EK, EL, EM, EN, EO, EP, EQ, ER, ES, ET, EU, EV, EW, EX, EY, EZ, FA, FB, FC, FD, FE, FF, FG, FH, FI, FJ, FK, FL, FM, FN, FO, FP, FQ, FR, FS, FT, FU, FV, FW, FX, FY, FZ, GA, GB, GC, GD, GE, GF, GG, GH, GI, GJ, GK, GL, GM, GN, GO, GP, GQ, GR, GS, GT, GU, GV, GW, GX, GY, GZ, HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG, HH, HI, HJ, HK, HL, HM, HN, HO, HP, HQ, HR, HS, HT, HU, HV, HW, HX, HY, HZ, IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH, II, IJ, IK, IL, IM, IN, IO, IP, IQ, IR, IS, IT, IU, IV, IW, IX, IY, IZ, JA, JB, JC, JD, JE, JF, JG, JH, JI, JJ, JK, JL, JM, JN, JO, JP, JQ, JR, JS, JT, JU, JV, JW, JX, JY, JZ, KA, KB, KC, KD, KE, KF, KG, KH, KI, KJ, KK, KL, KM, KN, KO, KP, KQ, KR, KS, KT, KU, KV, KW, KX, KY, KZ, LA, LB, LC, LD, LE, LF, LG, LH, LI, LJ, LK, LL, LM, LN, LO, LP, LQ, LR, LS, LT, LU, LV, LW, LX, LY, LZ, MA, MB, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MI, MJ, MK, ML, MM, MN, MO, MP, MQ, MR, MS, MT, MU, MV, MW, MX, MY, MZ, NA, NB, NC, ND, NE, NF, NG, NH, NI, NJ, NK, NL, NM, NN, NO, NP, NQ, NR, NS, NT, NU, NV, NW, NX, NY, NZ, OA, OB, OC, OD, OE, OF, OG, OH, OI, OJ, OK, OL, OM, ON, OO, OP, OQ, OR, OS, OT, OU, OV, OW, OX, OY, OZ, PA, PB, PC, PD, PE, PF, PG, PH, PI, PJ, PK, PL, PM, PN, PO, PP, PQ, PR, PS, PT, PU, PV, PW, PX, PY, PZ, QA, QB, QC, QD, QE, QF, QG, QH, QI, QJ, QK, QL, QM, QN, QO, QP, QQ, QR, QS, QT, QU, QV, QW, QX, QY, QZ, RA, RB, RC, RD, RE, RF, RG, RH, RI, RJ, RK, RL, RM, RN, RO, RP, RQ, RR, RS, RT, RU, RV, RW, RX, RY, RZ, SA, SB, SC, SD, SE, SF, SG, SH, SI, SJ, SK, SL, SM, SN, SO, SP, SQ, SR, SS, ST, SU, SV, SW, SX, SY, SZ, TA, TB, TC, TD, TE, TF, TG, TH, TI, TJ, TK, TL, TM, TN, TO, TP, TQ, TR, TS, TT, TU, TV, TW, TX, TY, TZ, UA, UB, UC, UD, UE, UF, UG, UH, UI, UJ, UK, UL, UM, UN, UO, UP, UQ, UR, US, UT, UU, UV, UW, UX, UY, UZ, VA, VB, VC, VD, VE, VF, VG, VH, VI, VJ, VK, VL, VM, VN, VO, VP, VQ, VR, VS, VT, VU, VV, VW, VX, VY, VZ, WA, WB, WC, WD, WE, WF, WG, WH, WI, WJ, WK, WL, WM, WN, WO, WP, WQ, WR, WS, WT, WU, WV, WW, WX, WY, WZ, XA, XB, XC, XD, XE, XF, XG, XH, XI, XJ, XK, XL, XM, XN, XO, XP, XQ, XR, XS, XT, XU, XV, XW, XX, XY, XZ, YA, YB, YC, YD, YE, YF, YG, YH, YI, YJ, YK, YL, YM, YN, YO, YP, YQ, YR, YS, YT, YU, YV, YW, YX, YY, YZ, ZA, ZB, ZC, ZD, ZE, ZF, ZG, ZH, ZI, ZJ, ZK, ZL, ZM, ZN, ZO, ZP, ZQ, ZR, ZS, ZT, ZU, ZV, ZW, ZX, ZY, ZZ

(B1 - B2 - F1)
(C1 - C2 - F2)
(D1 - D2 - E1)
(E1 - E2 - E'2)

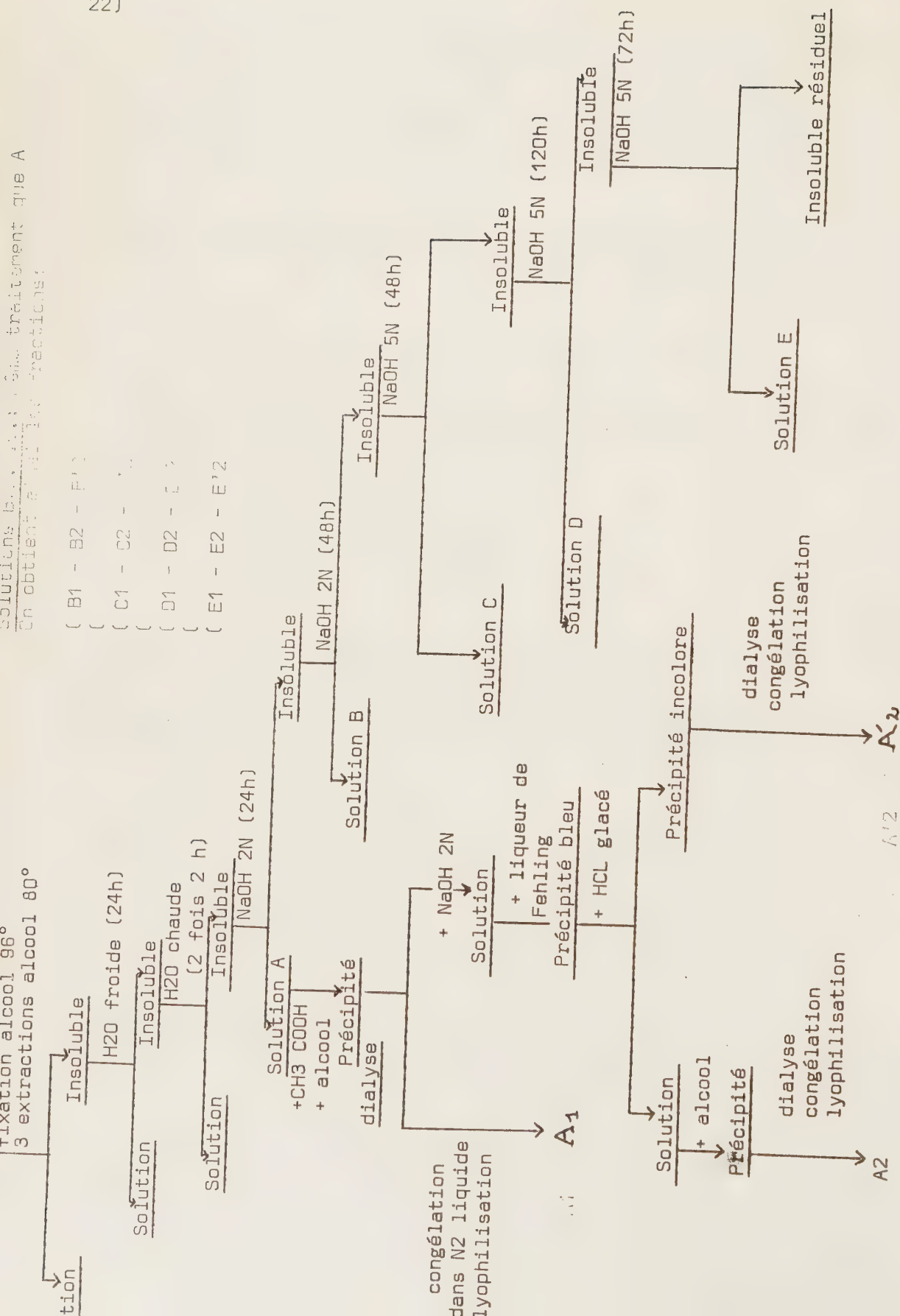


Tableau 5: Schéma des opérations d'extraction des polysaccharides des semences d'Aspergillus

Tableau 6: Composition en oses des différentes fractions de polysaccharides et dosage de leurs impuretés " azotées "

Les fractions sont obtenues par épuisements successifs par des solutions de soude de plus en plus concentrées et pendant des temps variables (voir tableau 5)

Fraction étudiée	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	E ₁	A' 2	B' 2	C' 2	D' 2	E' 2	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	E ₂	Insoluble résiduel
mg d'azote contenus dans 100 mg de " polysaccharides "	0,5	0,8	0,6	0,09	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
mg de substances réductrices libérées par 1'hydrolyse de 100 mg de poly- saccharides.	75	60	60	66	70	68	72	62	75	62	68	73	75	77	82	53
rapport mannose/ glucose, obtenu après hydrolyse des diverses fractions	0,81	1,02	1,11	0,97	1,06	1,04	1,04	1,03	0,99	0,97	0,98	0,94	0,97	1,09	0,94	1,0

acide, comme les diverses fractions de polysaccharides extraits par la soude, autant de glucose que de mannose. Les traitements par la soude n'ont vraisemblablement pas épuisé totalement le matériel végétal. L'insoluble résiduel est constitué essentiellement par des polysaccharides semblable à ceux extraits par la soude, il ne renferme que fort peu de cellulose; en effet, une hydrolyse acide plus forte (dans les conditions requises pour provoquer la dégradation de la cellulose) ne permet plus de libérer de sucres réducteurs.

- Toutes les fractions contiennent également des traces de galactose. La figure 8 montre un exemple de la composition d'une des fractions hydrolysées telle qu'elle apparaît après chromatographie en phase gazeuse.

Les fractions de polysaccharides obtenues à la suite des divers traitements par la soude ont donc toutes sensiblement la même composition chimique; l'insoluble résiduel est composé essentiellement par des hémicelluloses de même type. Cependant, il est possible que les fractions ainsi isolées ne soient que des mélanges + complexes de polysaccharides de type assez voisins mais variable quant à la taille des molécules. Il convient donc d'étudier maintenant l'homogénéité de ces fractions.

3^e) Etude de l'homogénéité des polysaccharides.

Les diverses fractions de polysaccharides peuvent contenir plusieurs constituants de même composition chimique, mais de poids moléculaire différent, chaque fraction a donc subi un tamisage moléculaire sur une série de gels " Séphadex ". De plus, pour déterminer si les polysaccharides correspondent à des glucomannanes ou à un mélange de glucanes et de mannanes, les oligosides obtenus après hydrolyse acide ménagée des polysaccharides ont été étudiés.

a) Tamisage moléculaire sur gel Sephadex:

Les polysaccharides (50mg) sont dissous dans 10 ml de soude 2N, le pH de la solution est abaissé à 9,0 par de l'acide chlorhydrique, puis le volume amené à 20ml avec du tampon tris 0,10M pH 9,0. 2 ml de cette solution sont déposés au sommet d'une colonne de gel Sephadex (hauteur 1m, diamètre 0,5 cm) puis élués par du tampon tris pH 9,0. Des fractions de 1,5 ml sont recueillies et leur teneur en glucides estimée par dosage avec le réactif à l'anthrone. Les diverses fractions de polysaccharides se sont comportées de façon identique lors de la filtration sur gel Sephadex: jusqu'au gel G 150, les " hémicelluloses " passent immédiatement à la limite du volume d'exclusion de la colonne. Le gel G 200, par contre, provoque un ralentissement de la migration mais ne permet pas d'obtenir plusieurs pics de sortie (fig 9)

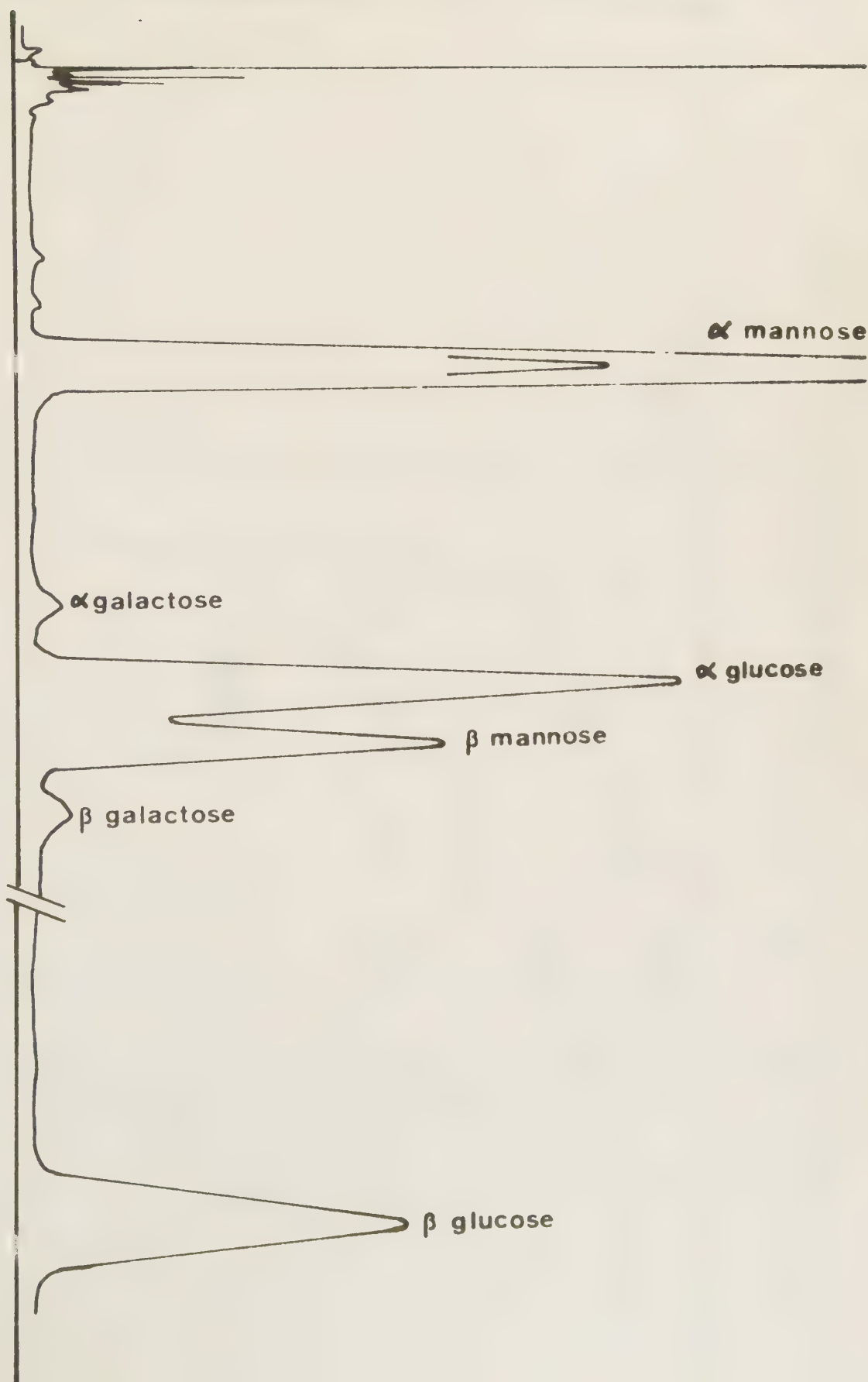


Fig. 8 : Chromatographie en phase gazeuse des dérivés TMS des oses libérés après hydrolyse acide des polysaccharides extraits des graines d'Asperge (fraction B'2).

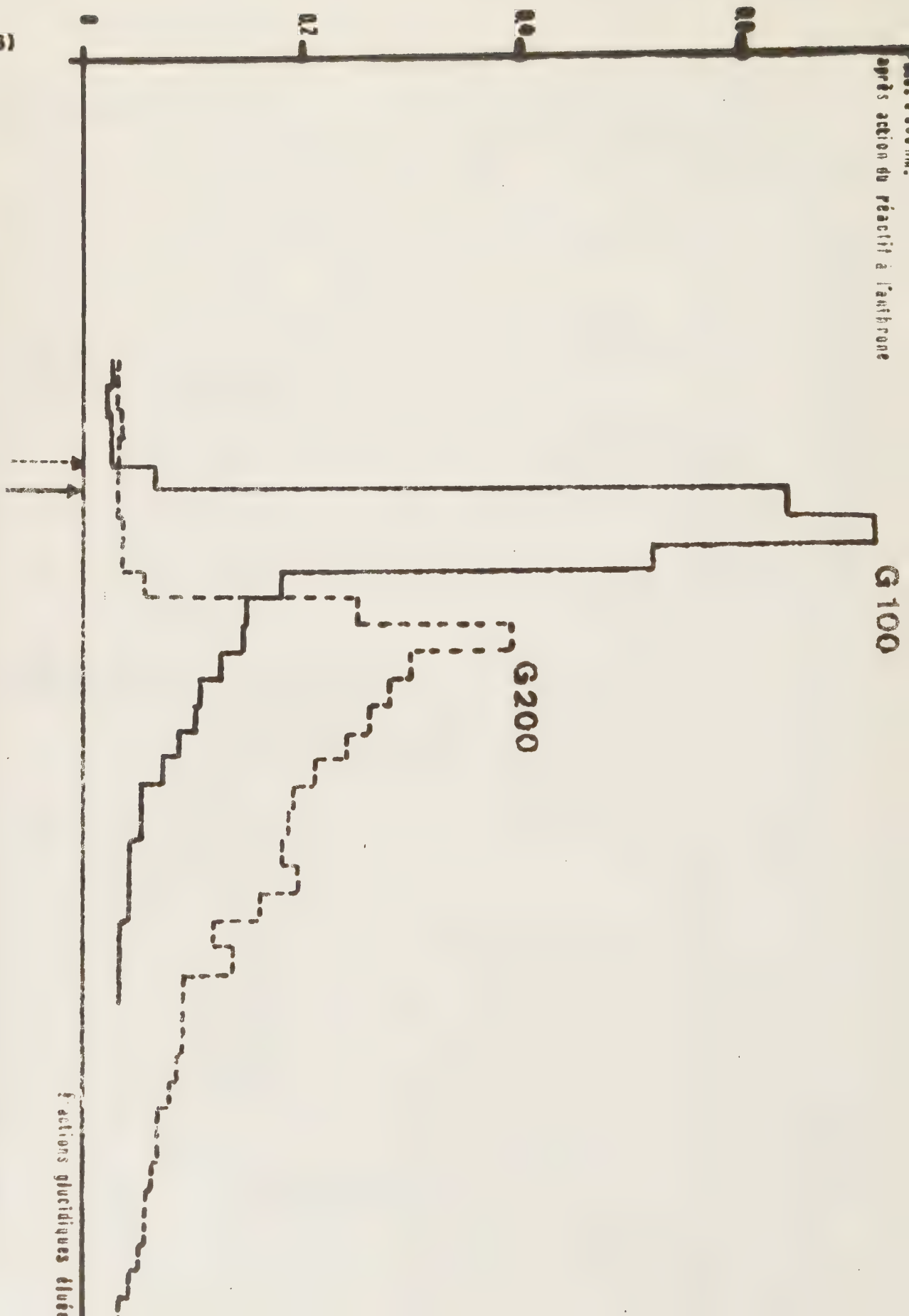


Fig. 3 : Tamissage moléculaire sur gel Sepharose des polysaccharides des cristaux d'Asperge.
(fraction B'2).

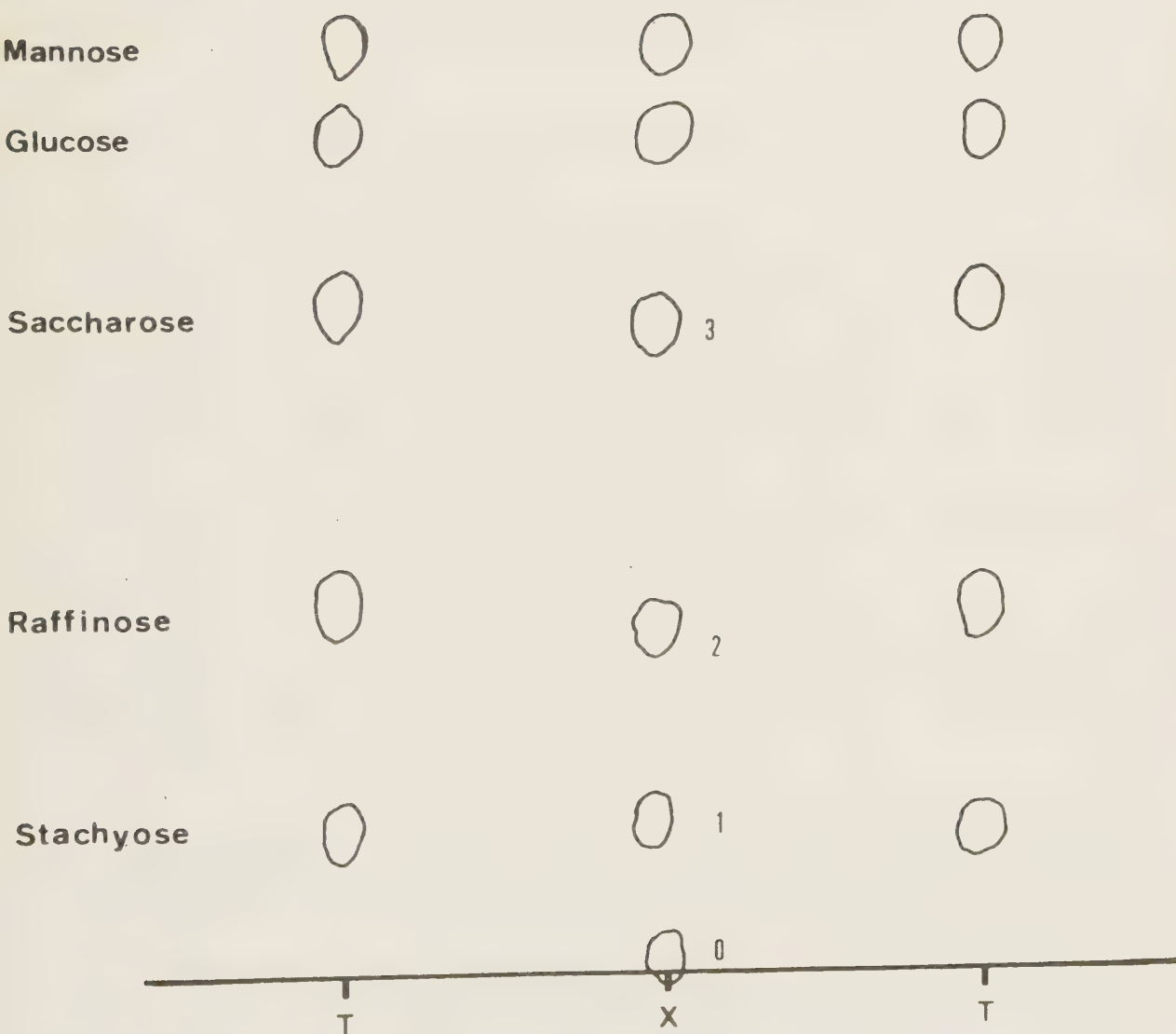


Fig. 10: Chromatographie des glucides solubles obtenus après hydrolyse acide ménagée des polysaccharides des graines d'Asperge (fraction B'₂).

T: mélange de glucides témoins.

X: solution obtenue après hydrolyse de la fraction B'₂.

Les diverses fractions extraites par la soude qui avaient, d'après les analyses, après hydrolyse acide, apparemment la même composition chimique, ont donc de plus le même comportement lors de la filtration sur gel " Sephadex ". C'est pourquoi les expériences suivantes ont été menées, non plus sur la série complète des fractions de polysaccharides mais sur une fraction déterminée.

b) Hydrolyse acide ménagée:

Les polysaccharides sont hydrolysés pendant trois heures, dans un bain-marie à 100 ° par une solution décimale d'acide sulfurique. Après neutralisation par le carbonate de strontium, la solution est concentrée et chromatographiée sur papier Whatmann N° 3 (chromatographie ascendante de 40h dans le solvant butanol acide acétique eau). Les oligosides ainsi séparés (O.I.2.3) (figure 10) sont élués séparément. Chaque éluat est concentré, soumis à une hydrolyse forte (SO_4H_2 N-30' à 100°) neutralisé, mis à sec, silylé et analysé par chromatographie en phase gazeuse. Chacun des oligoside libère à la fois du glucose et du mannose; l'un d'eux (le N° 2) libère en plus du galactose (tableau 7); en outre, le premier oligoside (N°3) contient autant de glucose que de mannose, il s'agit vraisemblablement d'un molécule mixte car, dans le cas contraire, nous aurions dû obtenir après l'hydrolyse acide deux oligosides homogènes (mannobiose et cellobiose), composés dont les Rf sont différents dans le solvant utilisé.

Tableau 7 : Composition des oligosides obtenus par hydrolyse ménagée des polysaccharides des graines d'Asperge (fraction B'2)

N° de l'oligoside élué à partir du chromatogramme de la figure 5	0	1	2	3
Hexose libéré après hydrolyse acide				
- Mannose	+	+	+	+
- Glucose	+	+	+	+
- Galactose	-	-	+	-

Les polysaccharides des graines d'asperge sont donc de très grosses molécules ($PM < 150\ 000$) mixtes composées de maillons de glucose et de mannose avec probablement quelques molécules de galactose. Il reste maintenant à déterminer la forme optique de ces divers hexoses et leur mode d'enchaînement.

4°) Détermination de la forme optique des hexoses constitutifs des polysaccharides.

Diverses expériences faites avec des préparations enzymatiques de provenance commerciale et avec une solution enzymatique obtenue à partir de graines d'Asperge permettent d'obtenir des renseignements relatifs à la forme optique des oses constitutifs des polysaccharides ainsi qu'à leur agencement. L'étude de la déviation de la lumière polarisée complète ces premiers résultats.

a) Hydrolyse des polysaccharides par des enzymes de provenance commerciale.

L'hydrolyse a été faite d'abord sur les polysaccharides "entiers" puis sur les oligosides obtenus par l'hydrolyse acide ménagée de ces polysaccharides.

Hydrolyse des polysaccharides "bruts"

50 mg de polysaccharides sont laissés 20h au bain-marie à 37° dans 10 ml de tampon en présence de l'enzyme étudiée et de quelques gouttes de toluène. Des essais d'hydrolyse sont réalisés avec les enzymes de provenance commerciale suivants : amylase α , amylase β , maltase (NBC); β glucosidase, β galactosidase (SIGMA); cellulase, hémicellase (FLUKA) (tableau 8). Les amylases α et β sont sans action sur les polysaccharides ce qui n'est guère étonnant si les polysaccharides sont des molécules "mixtes" contenant à la fois du glucose et du mannose; la maltase, la β glucosidase, ainsi que la β galactosidase sont également inactives, ce qui exclut la présence d' α glucose, de β glucose ou de β galactose à l'extrémité des molécules de polysaccharides. Toutefois, ce résultat négatif pourrait être dû à un simple empêchement stérique causé par la dimension importante des molécules de polysaccharides.

Par contre, l'action hydrolysante de la cellulase permet de supposer l'existence de liaisons de type β 1 $\longrightarrow$ 4. Toutefois, il nous faut signaler que la solution de l'enzyme utilisée n'a pas une action très spécifique. En effet, outre son action sur la cellulose, elle est également capable d'hydrolyser le β phénylglucose, et beaucoup plus faiblement l' α phénylglucose. Elle hydrolyse également le β phénylmannose, et très faiblement l' α phénylmannose (tableau 9); ce qui explique qu'après 24 heures de contact avec les polysaccharides des graines d'Asperge, la solution d'incubation soit constituée de: 28% de mannose, 71% de glucose et 1% de galactose.

Tableau 8: Action de diverses enzymes sur les polysaccharides des graines d'Asperge (fraction B'2)

Enzyme "commerciale" utilisée	mg de sucres réducteurs libérés après 20h. à 37° (pour 100 mg de polysaccharides dispersés dans une solution tamponnée)
α Amylase	0
β Amylase	0
α Maltase	0
β galactosidase	0
β GLUCOSIDASE	0
Cellulase	9,75
Hémicellulase	2,25

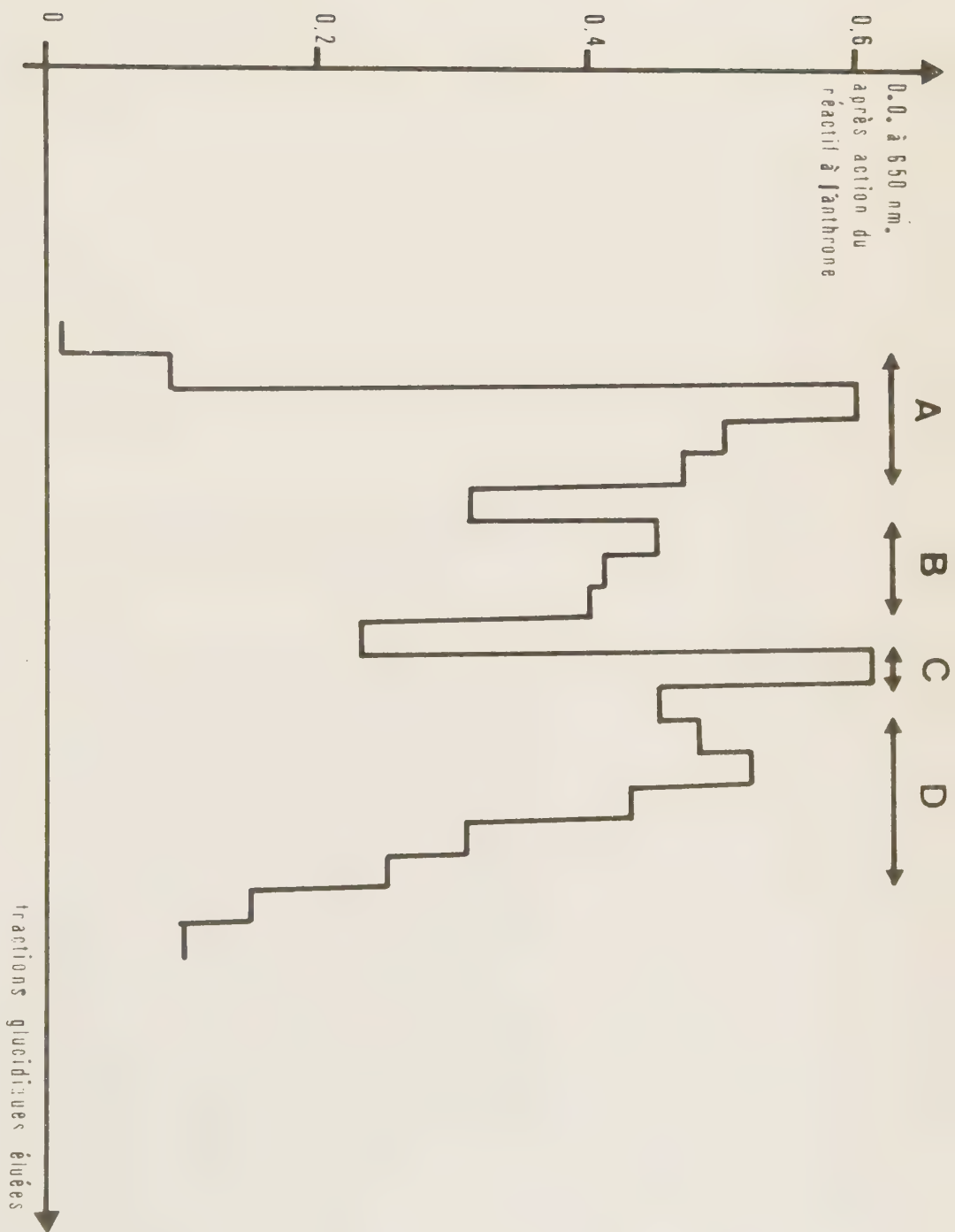


Fig. 11 : Chromatographie s/ biogel P_6 des glucides solubles libérés après hydrolyse acide ménagée des polysaccharides des graines d'Asperge. (fraction B'2).

Tableau 9: Action de la cellulase N.B.C. sur divers phénylglycosides.

Nature du substrat	μ M de substrat hydrolysé par 1 mg de cellulase après 18 heures d'incubation à 35°; pH 5,3.
α phényl glucose	19,4
β phényl glucose	28,9
α phényl mannose	0,82
β phényl mannose	2,40

Hydrolyse des oligosides obtenus après hydrolyse acide ménagée des polysaccharides:

150 mg de polysaccharides subissent une hydrolyse ménagée dans les conditions décrites précédemment (cf.p.22). Après neutralisation et concentration la solution est déposée au sommet d'une colonne de Biogel P2 (hauteur 50 cm et diamètre 2 cm) et éluée par de l'eau désionisée; les fractions collectées (de 3 ml chacune) sont dosées par le réactif à l'antrone (fig.11). Les fractions constitutives des quatre principaux pics (fig.11) sont réunies. Ces solutions A.B.C.D. sont amenées à un volume déterminé, puis des fractions aliquotes de chacune de ces solutions sont laissées 3 heures au bain-marie à 37° en présence des enzymes suivantes: β glucosidase, β galactosidase et maltase. Seule, la β glucosidase provoque la libération des sucres réducteurs. Les molécules de glucose sont donc bien sous forme β . La chromatographie sur papier des solutions A.B.C.D. (fig.12) permet de constater que la séparation obtenue par tamisage moléculaire sur Biogel était imparfaite et que chacune des ~~solutions~~ solutions contient, en fait, plusieurs glucides.

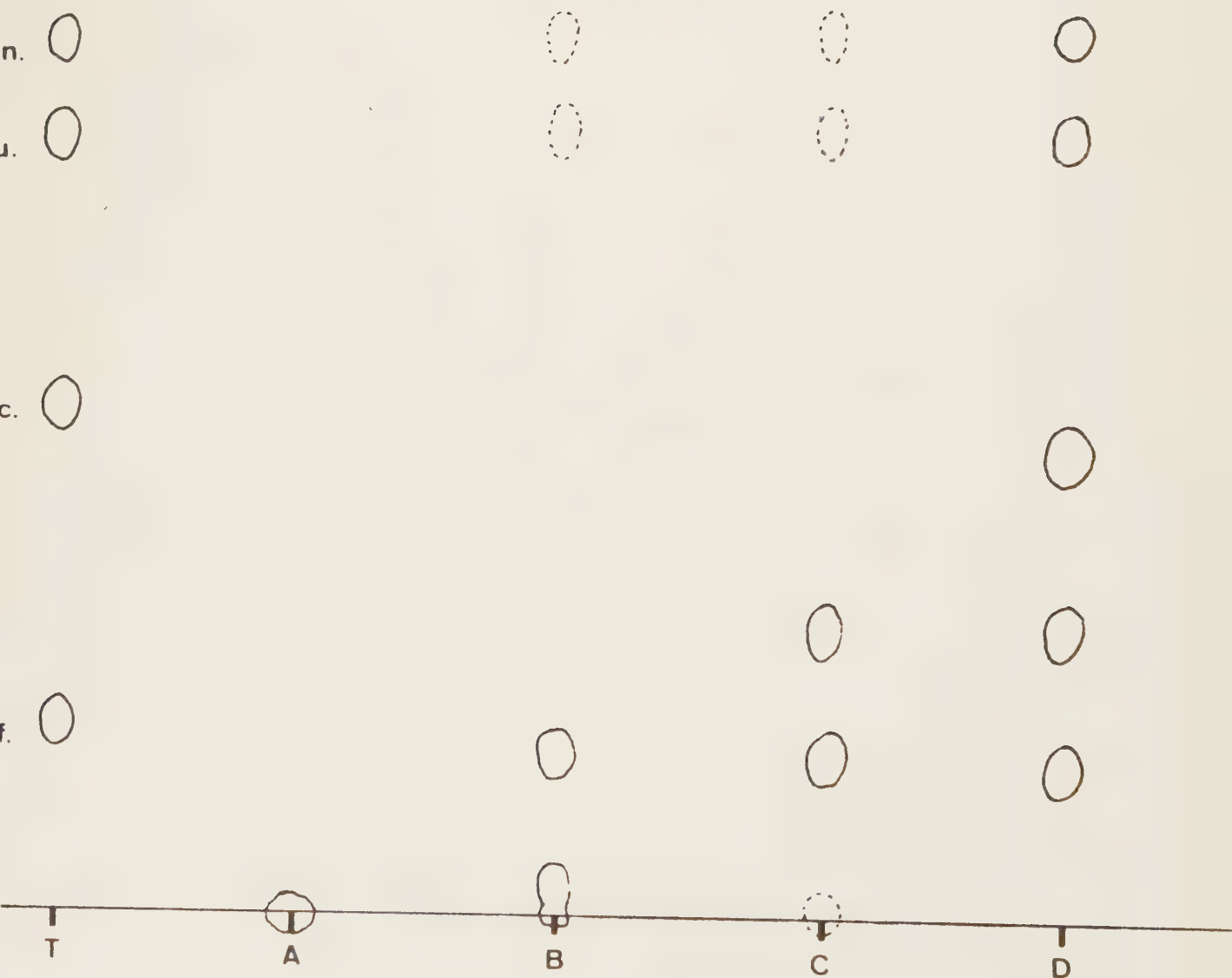


Fig. 12 : Chromatographie des fractions obtenues après filtration s/ biogel P_2 des oligosides provenant de l'hydrolyse ménagée des polysaccharides d'Asperge.

T : mélange de glucides témoins.

A - B - C : Solutions glucidiques obtenues après tamisage moléculaire s/ biogel P_2 des polysaccharides hydrolysés.

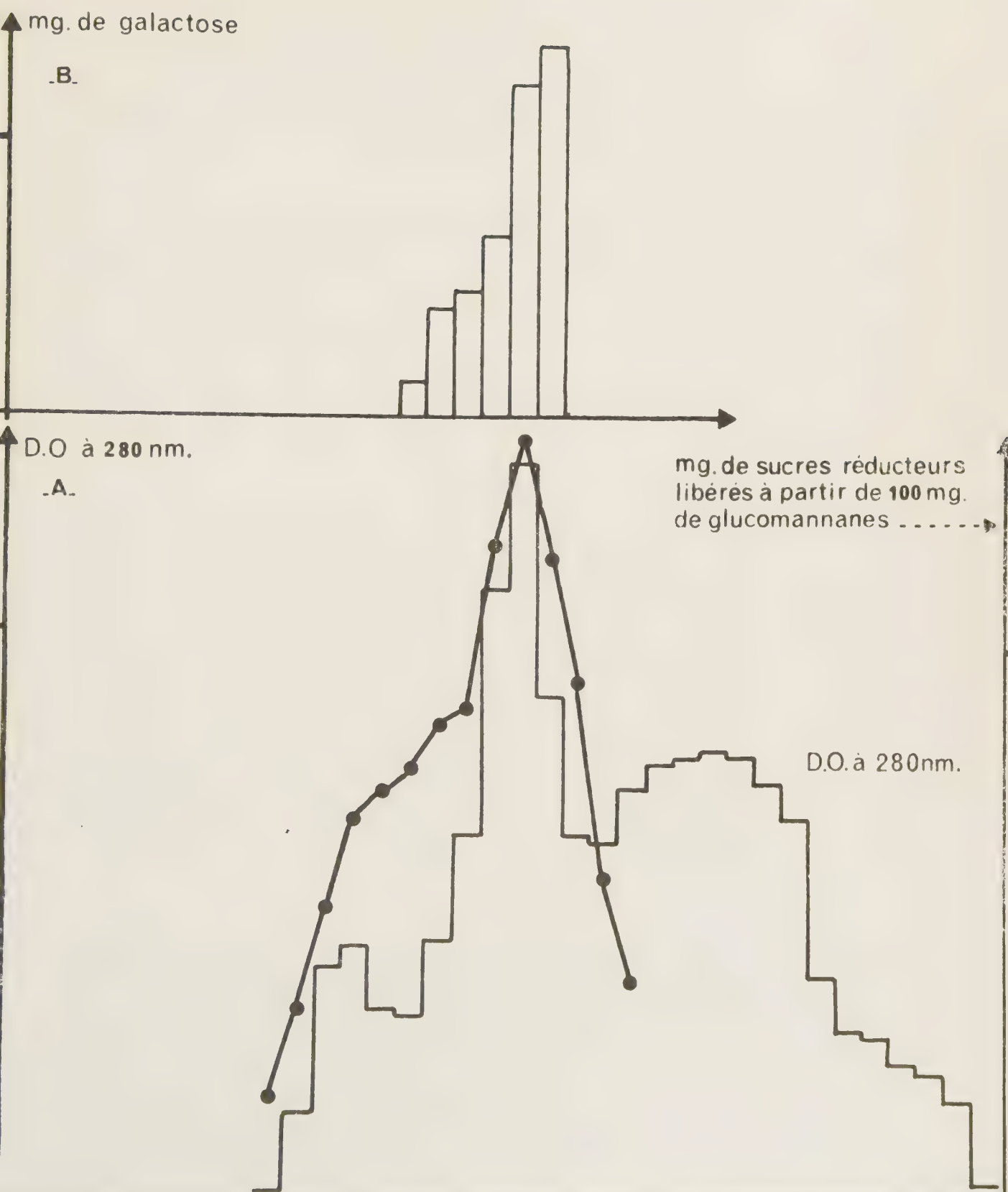


Fig. 13: Action sur les polysaccharides des différentes fractions protéiques éluées

β

Action de l'extrait " brut ".

Après 20h d'incubation à 37°C avec 50 mg de polysaccharides (fraction B'2) 2ml de solution enzymatique (soit environ 130 mg de protéines) provoquent la libération d'un mélange de sucres réducteurs (12 mg) contenant 49% de glucose, 48% de mannose et 3% de galactose.

5') Activité des diverses fractions obtenues après tamisage moléculaire sur gel Sephadex de l'extrait enzymatique.brut.

5 ml de solution enzymatique, préparée comme il a été décrit ci-dessus, sont déposés au sommet d'une colonne de gel Sephadex G 100 (90 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre) et éluées par du tampon acétate pH 4,7. Les fractions recueillies sont d'environ 12 ml chacune. L'action de ces fractions sur les glucomannanes des graines d'Asperge et sur certains substrats très spécifiques est alors étudiée.

- Action sur les glucomannanes.

10 ml de chacune des fractions " enzymatiques " sont laissés 20 h au bain-marie à 37° en présence de 40 mg de polysaccharides. Les réactions sont arrêtées par immersion dans l'eau bouillante pendant 2 mn. Les échantillons sont alors filtrés, amenés à volume déterminé, puis analysés quantitativement (dosage des substances réductrices libérées) et qualitativement (silylation et chromatographie en phase gazeuse). Comme le montre la figure 13, la fraction enzymatique qui possède la plus forte activité hydrolasique provoque la libération d'un mélange d'hexoses dont la composition: 37% de glucose, 27% de mannose et 36% de galactose, est fort éloignée de celle obtenue avec l'extrait enzymatique initial; il semble donc vraisemblable que l'osidase la plus active de la fraction enzymatique est une galactosidase et que les extrémités libres des glucomannanes sont constituées par des molécules de galactose.

Fig.13. Action sur les polysaccharides (fraction B'2) dans différentes fractions protéiques éluées après tamisage moléculaire.

- A) quantité de sucres réducteurs libérés après 20h d'incubation à 37° de chacune des fractions avec 100 mg de polysaccharides.
- B) quantité de galactose (en mg pour 100 mg d'oses totaux) libéré après 20h d'incubation de chacune des fractions protéiques avec 100 mg de polysaccharides.

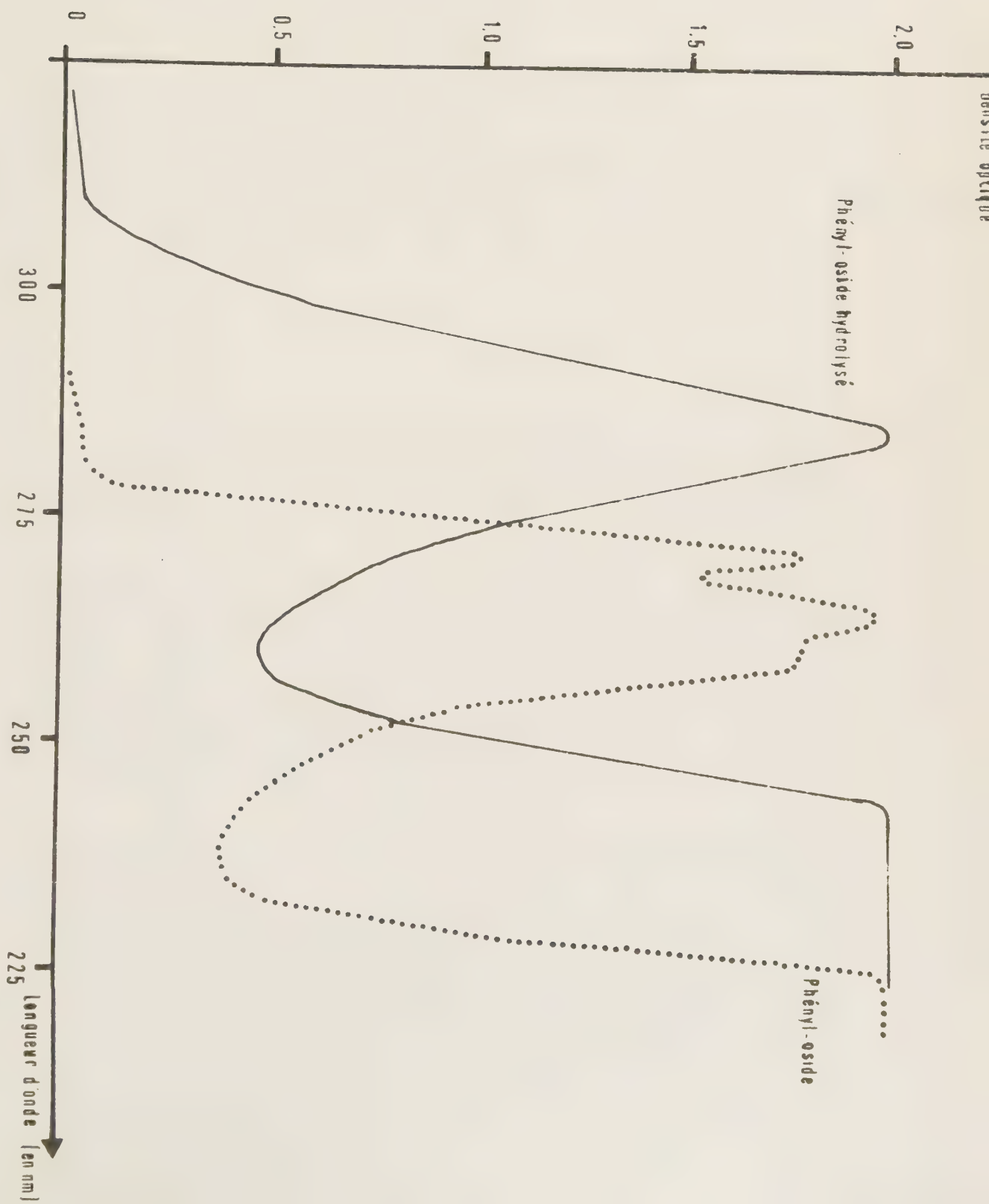


Fig. 14 : Spectre d'absorption (en milieu alcalin) d'un phényl-oxide, avant et après hydrolyse.

- Recherche des activités α et β glucosidasiques, α et β mannosidasiques, α galactosidasique des diverses fractions enzymatiques obtenus à partir de l'extrait enzymatique total.

La préparation enzymatique obtenue à partir de graines d'Asperge est soumise à un tamisage moléculaire sur gel Sephadex G 100. Les fractions recueillies sont placées au bain-marie à 37°C en présence de substrats spécifiques: α et β phénylglucosides, α et β phénylmannosides, α phénylgalactosides. Le phénol libéré est dosé en milieu alcalin au spectrophomètre à 285 nm. En effet, dans ces conditions les divers phényl-osides n'absorbent pas les rayons lumineux (fig.I4) *

*

Ces substrats sont synthétisés de la manière suivante:

α et β phénylglucosides: le β pentacétyl-glucoside est obtenu par action à chaud sur le glucose d'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium. Les α et β phényl-tétracétyl-glucosides sont alors préparés selon la méthode de Montgomery (64) puis désacétylés par le méthylate d'ammonium (44).

α et β phénylmannosides: le β pentacétylmannoside est synthétisé à partir de mannose, d'anhydride acétique et de chlorure de zinc fondu en prenant soin que la température du mélange ne dépasse pas 30/40° (97). Après 24h à 0°, le produit est cristallisé en versant le mélange dans un volume important d'eau glacée (41). La phénylation est effectuée selon la technique de Helferich et Winkler (40) dont le rendement satisfaisant pour l' α phényltétracétyl-mannoside (30%), est malheureusement très mauvais pour le β phényl-tétracétylmannoside (moins de 2%). La désacétylation est obtenue par l'action du méthylate d'ammonium.

α phénylgalactoside : Ce produit nous a été donné par Madame LECHEVALLIER. (53)

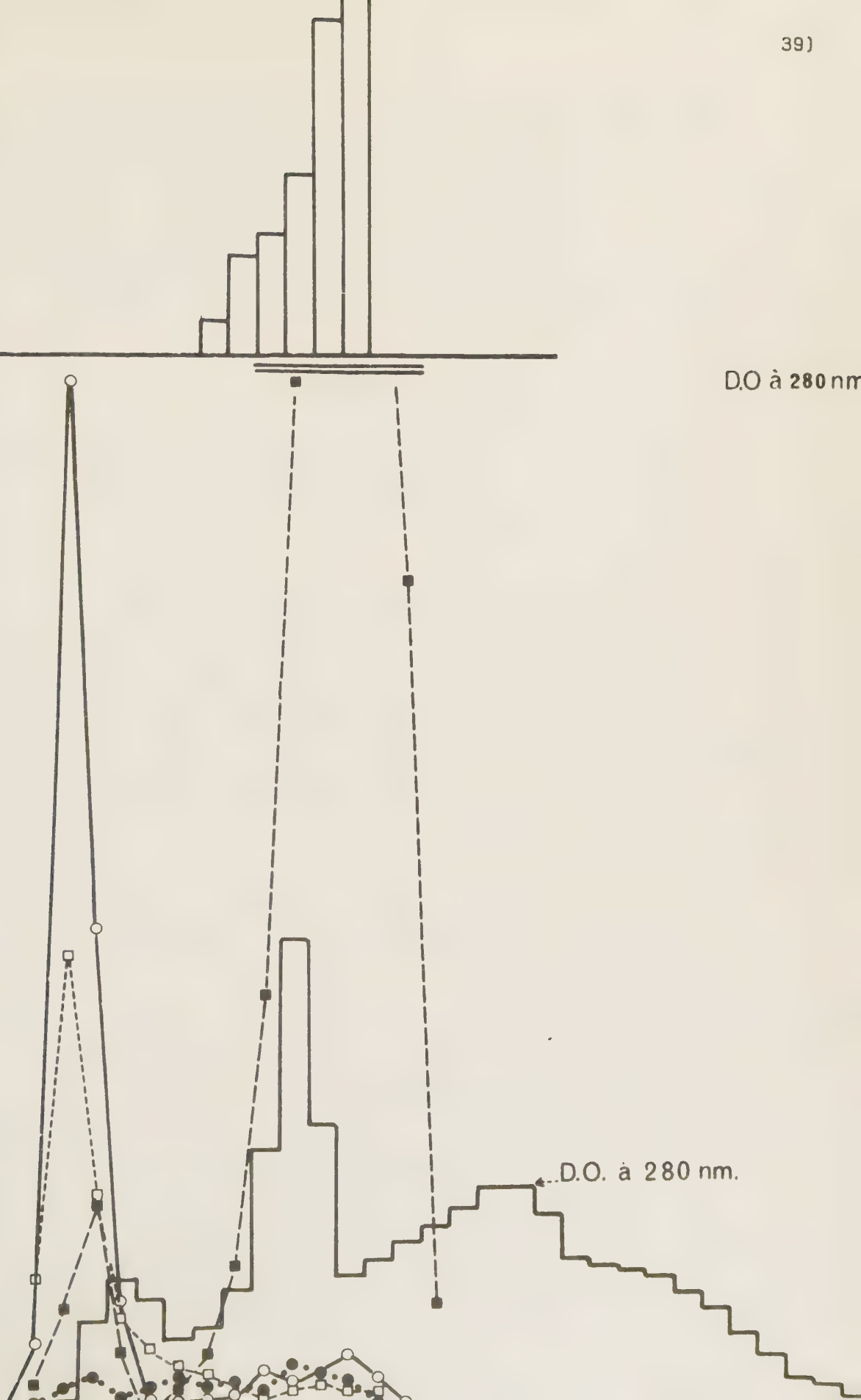
Afin de contrôler la pureté des phényl-osides synthétisés, les dérivés triméthylsilyls de ces produits sont préparés et analysés par chromatographie en phase gazeuse. Cette technique permet de constater que l' α phénylglucoside contient jusqu'à 30% de β phénylglucoside. Les autres substrats, par contre, sont d'une pureté satisfaisante (fig.I5)

.B.

activités
sidasiques

.A.

D.O à 280 nm



40)

Résultats: Comme le montre la figure I6, les fractions qui provoquent la libération d'une quantité relativement importante de galactose à partir des glucomannanes sont celles qui possèdent la plus forte activité α galactosidasique. Cette fraction qui possède une intense activité hydrolasique et α galactosidasique étant par ailleurs extrêmement peu active sur les β galactosides (ex: le lactose), il apparaît vraisemblable que les extrémités des chaînes de polysaccharides précédemment extraits et purifiés sont constitués par des molécules d' α galactose.

c) Pouvoir rotatoire

En solution dans la soude les polysaccharides dévient très faiblement la lumière polarisée vers la gauche, ce qui confirmerait la forme β des molécules de glucose et de mannose.

5°) Etude de la structure des polysaccharides.

Afin de déterminer la structure de ces grosses molécules, les radicaux - OH libres des hexoses constitutifs sont remplacés par des radicaux -OCH₃. Les liaisons osidiques des polysaccharides méthylés sont alors rompues par hydrolyse acide. Les oses ainsi obtenus ne portent des groupements méthyle que sur les carbones non engagés dans les liaisons osidiques. Les oses méthylés ainsi obtenus sont analysés par chromatographie sur papier.

a) Méthylation des oses constitutifs des polysaccharides.

La masse moléculaire élevée des glucomannanes oblige à faire successivement:

Figure I6: Tamisage moléculaire sur gel Sephadex G 100 de l'extrait enzymatique " brut ".

A) activités osidasiques des diverses fractions protéiques éluées

□ --- □ activités α et β glucosidasiques

○ ——— ○ activité α mannosidasique

● ● activité β mannosidasique

■ --- ■ activité α galactosidasique

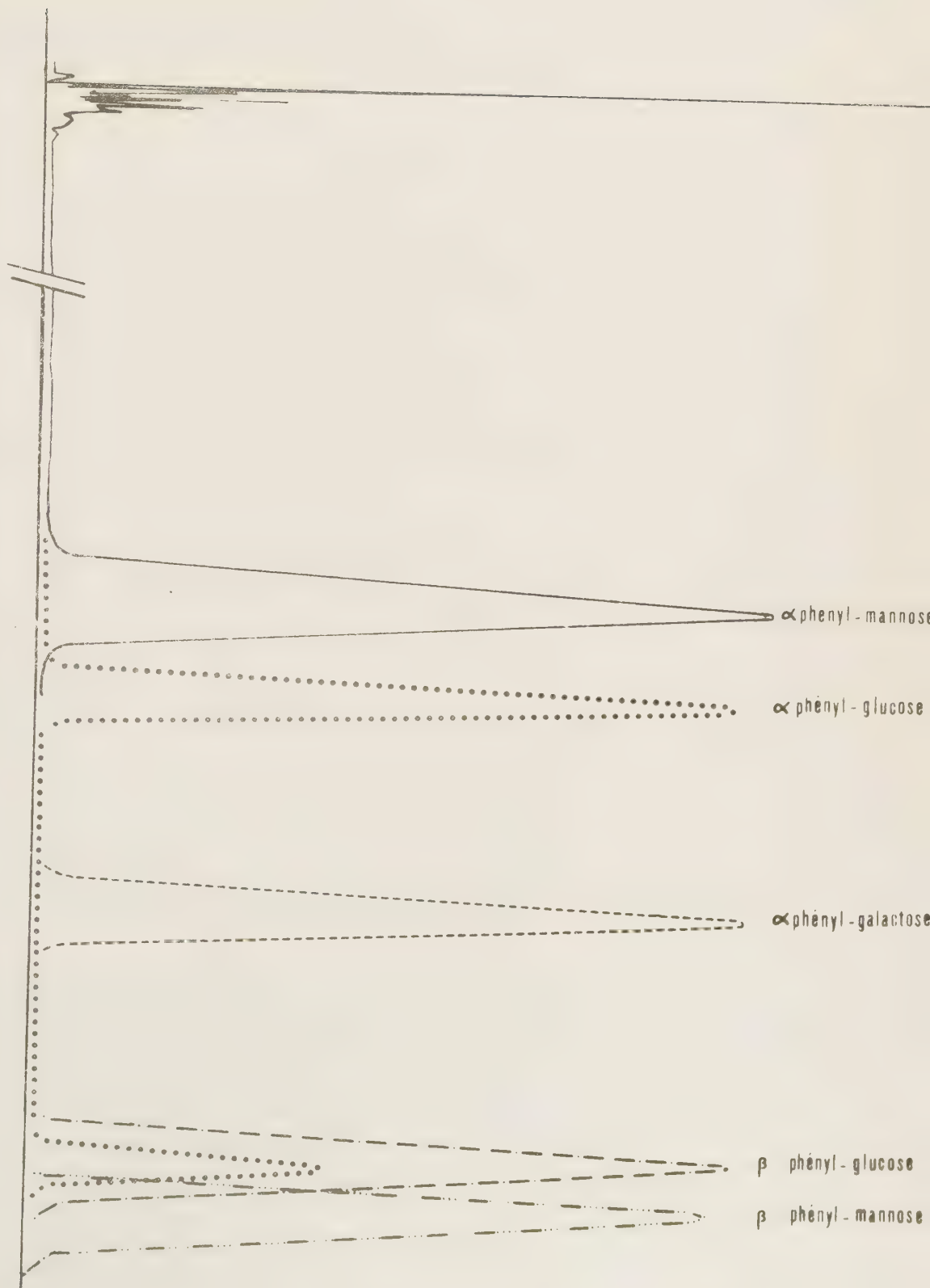
Les activités sont estimées par l'augmentation de la D.O à 250 nm (mesures faites à pH 11) après incubation de chaque fraction protéique avec les divers phényl-osides.

B) quantité de galactose libéré après 20h d'incubation de chaque

Fig. 15: Chromatographie en phase gazeuse des dérivés TMS des divers phényl-osides synthétisés.

Nature de la phase utilisée: DTGS 20% célite (100/120).

Température de la colonne: 176°.



- 10 méthylations par le diméthylsulfate, en présence de soude (38); comme nous l'avons vu précédemment, les glucomannanes, en effet, ne sont solubles que dans la soude.
- 2 méthylations par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent (77) afin d'obtenir la méthylation de tous les radicaux.

Protocole opératoire.

✓ 1 g de polysaccharides est dissous dans 10 ml de soude à 30%. 6 ml de soude à 30% et 3 ml de diméthylsulfate sont alors ajoutés à la solution sodique; cette opération est répétée dix fois, un intervalle de 10 mn étant observé entre chaque addition. Le mélange est agité pendant 24 heures à la température du laboratoire, puis plongé dans un bain-marie bouillant; le précipité qui apparaît alors en surface est recueilli par filtration, lavé à l'eau chaude et séché sous vide. Ce produit, partiellement méthylé, est dissous dans 20 ml de dioxane et subit neuf autres méthylations de ce type.

Le polysaccharide partiellement méthylé est dissous dans 20 ml de diméthylsulfoxyde (102); 20 ml d'iodure de méthyle et 5 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé, sont alors ajoutés; après 48 h d'agitation en erlenmeyer bouché, 20 ml d'iodure de méthyle et 5 g d'oxyde d'argent sont à nouveau versés dans la solution. Après 48h d'agitation, le mélange est centrifugé; le précipité subit alors une extraction par du chloroforme et est à nouveau centrifugé. Après cinq extractions de ce type, les surnageants sont réunis et l'iode éliminé avec une solution d'hyposulfite de sodium à 15%. La solution chloroformique est lavée avec de l'eau (qui entraîne les sels minéraux) puis déshydratée par passage sur sulfate de sodium et concentrée sous pression réduite. Le résidu sirupeux est desséché sous azote et conservé dans un dessiccateur.

b) Hydrolyse acide des polysaccharides méthylés.

Quelques mg de polysaccharides méthylés sont dissous dans 3-4 ml de solution hydroalcoolique, puis hydrolysés par SO_4H_2 2N (2h à 100°). Après neutralisation par le carbonate de strontium et élimination du précipité formé, la solution est concentrée et chromatographiée sur papier.

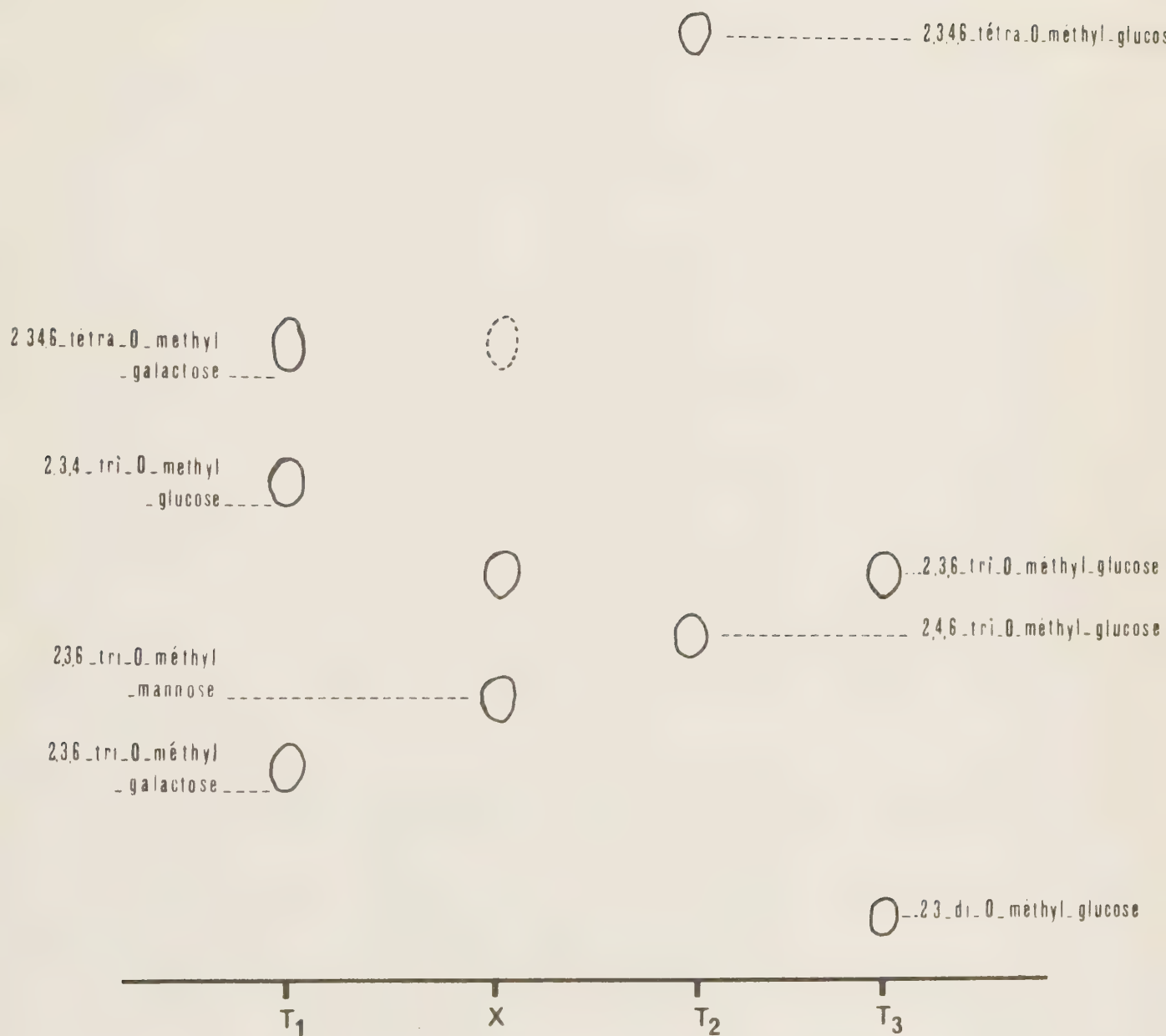


Fig. 17 : Chromatographie des dérivés méthylés des oses constitutifs des polysaccharides des graines d'Asperge (fraction B'2).

- T_2 - T_3 : sucres méthylés témoins.

: solution obtenue après hydrolyse acide des polysaccharides méthylés.

c) Etude des produits obtenus après hydrolyse acide.

La chromatographie est effectuée dans les conditions mises au point par F. PETEK (72): chromatographie ascendante de 24 h dans le mélange isooctane-isopropanol-solution aqueuse d'ammoniaque à 10%: 62:25:2. Les hexoses méthylés sont révélés par le réactif de Partridge à l'oxalate d'aniline (72). Les di, tri, tétra-o-méthyl-glucosides et galactosides sont déterminés en se référant à la position de substances témoins; par contre le 2, 3, 6 tri-o-méthyl-mannose est identifié par son Rf. Les chromatographies sur papier des produits libérés après hydrolyse acide des polysaccharides méthylés (fig.I7) confirment les premiers résultats obtenus par l'étude de l'hydrolyse enzymatique des glucomannanes. En effet, les composés suivants ont été identifiés: les 2,3,6 triméthyl-glucose et mannose (très abondants) et le 2,3,4,6 tétraméthyl-galactose (à l'état de traces). L'existence de liaisons 1 $\longrightarrow$ 4 entre les molécules de glucose et de mannose est donc probable ainsi que la présence de galactose à l'extrémité des chaînes. De plus, l'absence de dérivés diméthylés des oses obtenus après hydrolyse acide des polysaccharides permet de penser qu'il n'y aurait pas de ramifications dans leur molécule.

Cependant les traces de tétraméthylgalactose permettent de supposer la présence, de place en place, de molécules de galactose " piquées " le long de la chaîne. En effet, nous avons constaté que l'hydrolyse acide des glucomannanes libérerait, à côté du glucose et du mannose, environ 1% de galactose; or si les glucomannanes ont une masse moléculaire voisine de 150 000 ceci correspond à quelque 8 molécules de galactose qui pourraient être " accrochées " sur la chaîne composée de glucose et de mannose. S'il en est bien ainsi quelques hexoses diméthylés devraient figurer sur les chromatographies des produits obtenus après hydrolyse acide des polysaccharides méthylés; cependant, la sensibilité du révélateur utilisé rend leur mise en évidence très difficile.

Conclusion.

Les graines d'Asperge renferment d'importantes quantités de glucomannanes, ces polysaccharides se présentent comme de grosses molécules linéaires (probablement plus de 800 unités de β glucose et de β mannose reliées par leurs carbones 1 et 4) vraisemblablement terminées par des molécules d' α galactose. Cette structure est semblable à celle que ANDREWS, HOUGH et JONES (5) avaient décrite pour les polysaccharides des graines d'Iris sibirica et d'Iris ochroleuca.

II) Polysaccharides des graines d'Endymion nutans.

Les techniques d'extraction utilisées pour les semences d'Asperge ont été appliquées aux semences de Jacinthe, mais, seules deux fractions A et B ont été isolées; ces deux fractions correspondent respectivement aux deux extractions par la soude 2N (A) et aux trois extractions par la soude 5N (B) (tableau 11); l'insoluble résiduel a également été étudié.

Le tableau 12 contient les résultats des analyses chimiques de ces fractions. A la différence des graines d'Asperge, celles de Jacinthe semblent contenir au moins deux sortes d'hémicelluloses différant entre elles par la valeur du rapport M/G. L'insoluble résiduel semble très voisin des polysaccharides B. Les polysaccharides A, par contre, ont le même rapport M/G que les hémicelluloses extraites par l'eau et précipitées par l'alcool (cf. tableau 4); ces hémicelluloses sont donc vraisemblablement très faiblement solubles dans l'eau. Les deux fractions A et B ont le même comportement lors de leur filtration sur gel "Sephadex"; en solution dans du tampon "tris" pH 9,0 et élués par ce même tampon, ces polysaccharides ne sont pas retenus par le gel G150, mais leur sortie est ralentie sur le gel G200, sans qu'il soit possible d'observer plusieurs pics de sortie (fig. I8). Les deux fractions sont donc constituées par des polysaccharides de M.M. très élevée ($< 150\ 000$).

Tableau 12: Composition chimique des différentes fractions des polysaccharides isolées des semences de Jacinthe des bois.

Les deux fractions A et B résultent d'épuisements successifs par des solutions de soude de plus en plus concentrées (voir tableau 11)

Fraction étudiée	A	B	Insoluble final
Mg d'azote contenus dans 100 mg de polysaccharides	0,8	0	0,8
Mg de substances réductrices libérées par l'hydrolyse acide de 100 mg de polysaccharides	65	70	51
Rapport mannose/glucose	0,95	1,65	1,60

Tableau 11: Schéma de l'extraction des polysaccharides des graines de Jacinthe.

Graines broyées

fixation alcool 96°
3 extractions alcool 80°

Solution

Insoluble

H₂O froide

Solution

Insoluble

+ alcool

Solution A1

Précipité A2

H₂O chaude
(2 fois 2h)

Solution

Insoluble

+ alcool

Solution B1

Précipité B2

NaOH 2N
(48h)

Solution A

Insoluble

NaOH 2N

A et A' solutions réunies

B, B' et B''

"

A

B

Solution A'

Insoluble

NaOH 5N (48h)

Solution B

Insoluble

NaOH 5N (120 h)

Solution B'

Insoluble

NaOH 5N (72 h)

Solution B''

Insoluble
résiduel

Les deux solutions subissent
le traitement suivant:

Solution sodique

+ CH₃ COOH
+ alcool

surnageant

précipité

dialyse
+ NaOH 2N ou 5N

Solution sodique

+ liqueur de Fehling

Solution

précipité bleu

+ HCl + alcool

dialyse

précipité incolore

congélation

lyophilisation

poudre

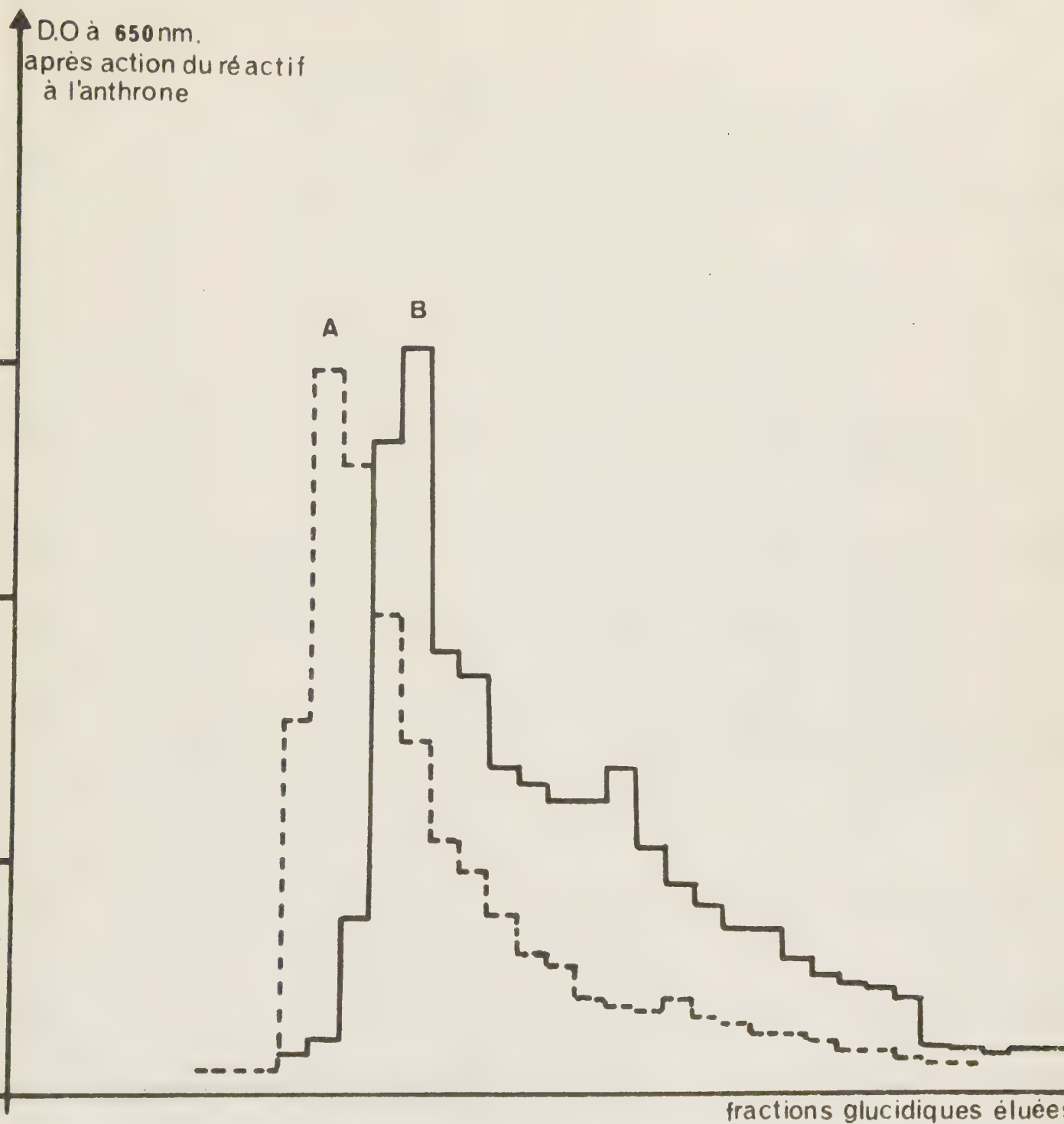


Fig. 18 : Tamissage moléculaire sur gel Séphadex G 200 des 2 fractions A et B (polysaccharides extraits des graines de Jacinthe).

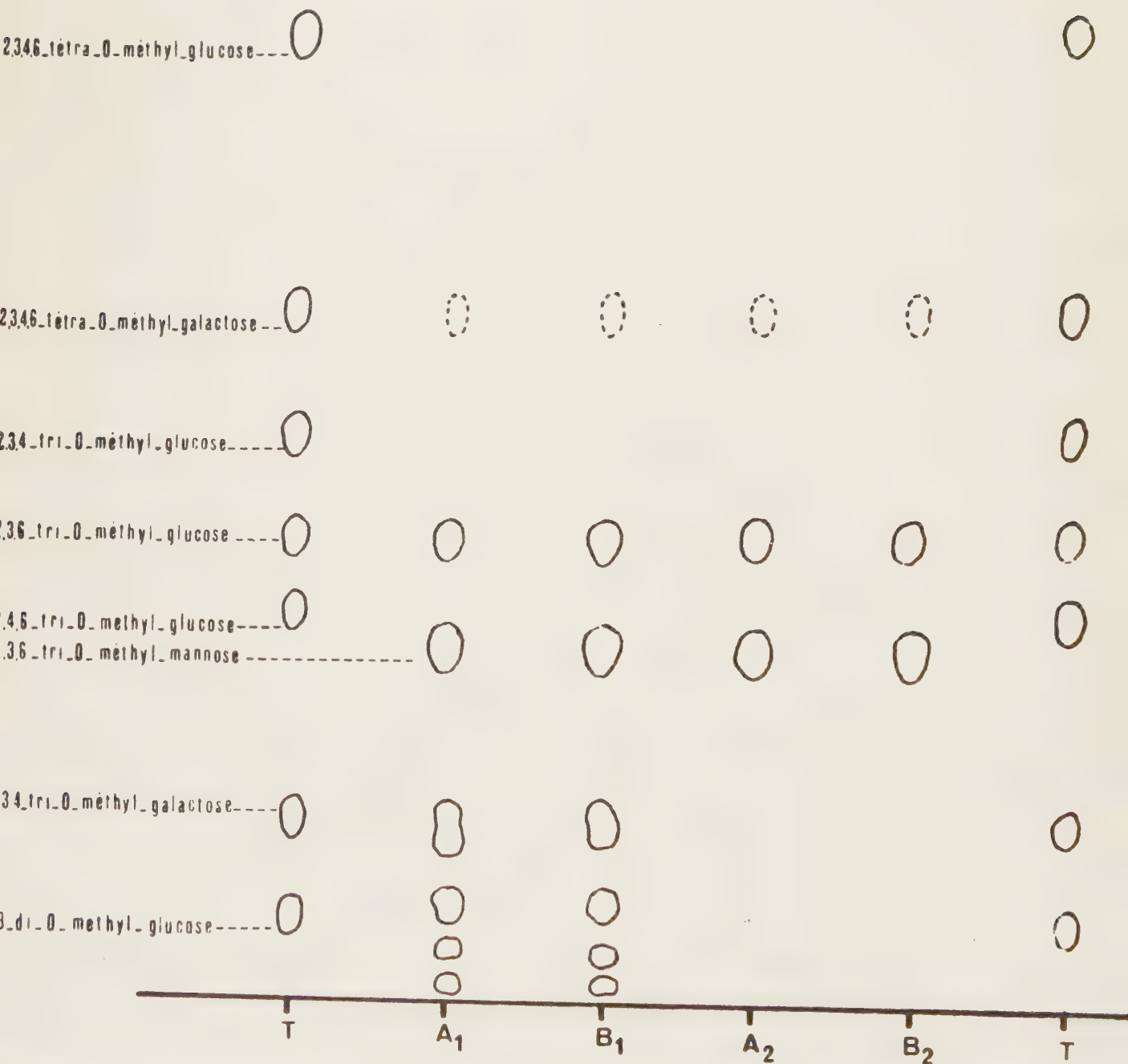


Fig. 19 : Chromatographie des dérivés méthylés des oses constitutifs des polysaccharides des graines de Jacinthe (fractions A et B).

A₁ B₁ : solutions obtenues après hydrolyse des polysaccharides ayant subi 10 méthylation au DMS (diméthylsulfate) et 2 aliiodure de méthyle.

A₂ B₂ : solutions obtenues après hydrolyse des polysaccharides ayant subi 10 méthylation au DMS (diméthylsulfate) et 4 aliiodure de méthyle.

L'hydrolyse ménagée des deux polysaccharides A et B libère des oligosides contenant tous du glucose et du mannose. Il s'agit donc vraisemblablement dans les deux cas de glucomannanes. Leur structure a été étudiée, comme dans le cas des polysaccharides des graines d'Asperge, après méthylation des oses constitutifs.

Pour méthyler les polysaccharides A et B, il nous a fallu effectuer, outre les dix traitements par le diméthylsulfate et les deux traitements par l'iodure de méthyle, deux méthylations supplémentaires par l'iodure de méthyle (fig.19). Cette dernière opération fait disparaître la série des dérivés diméthylés libérés par hydrolyse acide dûs, non pas à l'existence de ramifications dans les molécules de polysaccharides, mais simplement à une méthylation incomplète. Les glucomannanes A et B ne présentent donc pas de ramifications dans leurs molécules. Les chaînes linéaires des polysaccharides A et B sont constituées par des molécules de glucose et de mannose liées par leurs carbones 1 et 4, des molécules de galactose occupant les extrémités. En effet, (fig.19) les chromatographies sur papier révèlent la présence de 2,3,6 triméthyl-glucose et de 2,3,6 triméthyl-mannose ainsi que des traces de 2,3,4,6 tétra-o-méthyl-galactose.

Comme lors de l'étude des polysaccharides des graines d'Asperge, les hémicelluloses des semences de Jacinthe sont mises en présence de diverses enzymes de provenance commerciale. Les α et β glucosidases ainsi que la β galactosidase sont sans action; le galactose présent aux extrémités des chaînes des deux polysaccharides A et B est donc sous forme α . Les amylases α et β sont inactives; la cellulase, par contre, hydrolyse A et B (fig.20); les molécules de glucose sont donc vraisemblablement sous forme β . Ceci est confirmé par deux séries d'expériences supplémentaires: la mesure de la déviation de la lumière polarisée et l'hydrolyse enzymatique des oligosides obtenus après hydrolyse acide ménagée des polysaccharides. En solution dans la soude les hémicelluloses A et B dévient très faiblement la lumière polarisée vers la gauche. Les oligosides qu'ils libèrent après hydrolyse acide ménagée sont attaqués par la β glucosidase mais non par la maltase (tableau I3). Les graines de Jacinthe contiennent donc d'importantes quantités de glucomannanes qui représentent à peu près la seule forme de polysaccharides cellulaires (la cellulose et les composés pectiques sont presque inexistantes). Il existe au moins deux sortes de glucomannanes, de structure et de masse moléculaire identiques, mais qui diffèrent par les quantités respectives de glucose et de mannose qu'elles renferment.

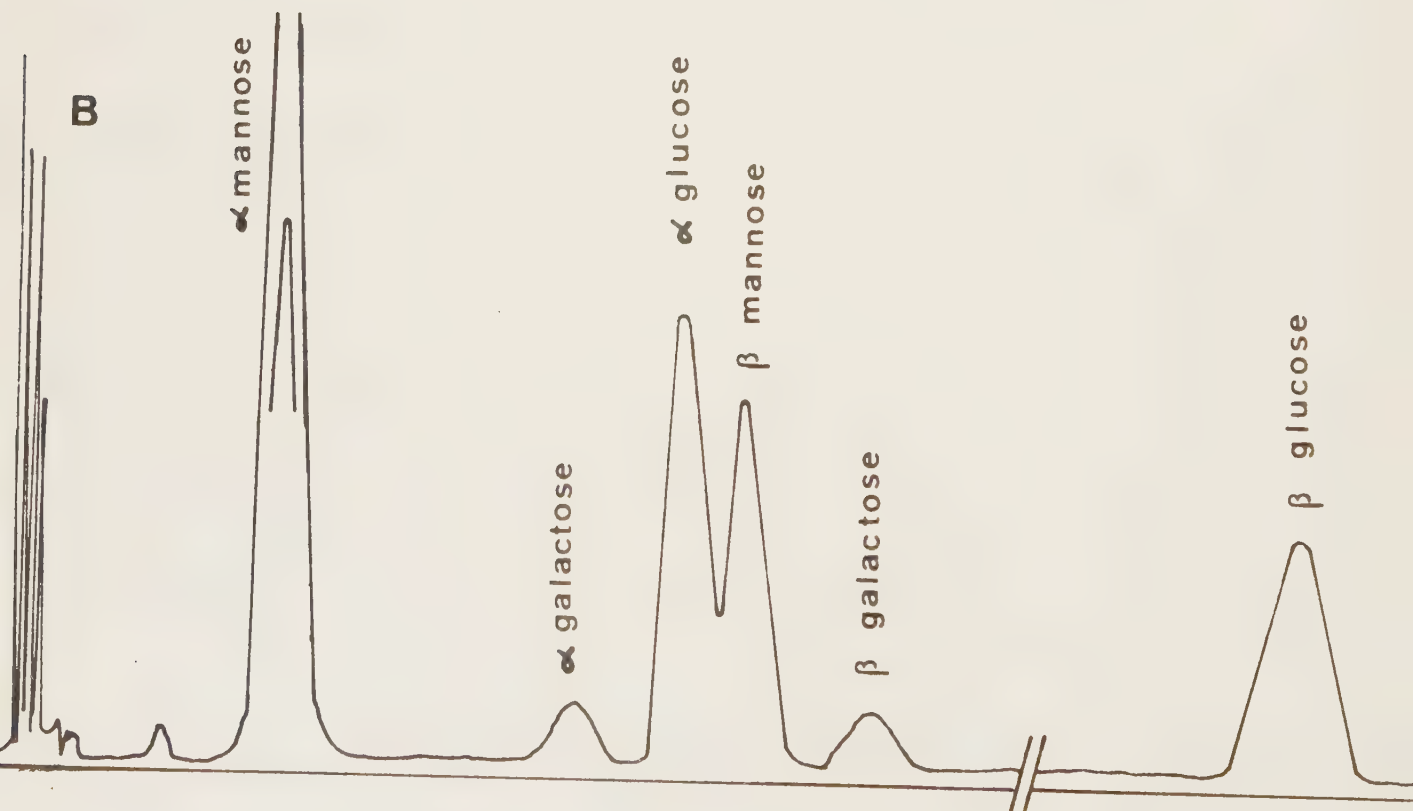


Fig. 20 : Chromatographie en phase gazeuse des dérivés TMS des oses obtenus après 20 h d'incubation des fractions A et B avec une solution de cellulase

Tableau 13:- Action des diverses solutions enzymatiques sur les oligosides libérés après hydrolyse acide ménagée des polysaccharides des graines de Jacinthe (fractions A et B)

Les oligosides sont numérotés dans l'ordre de leur sortie après filtration sur Biogel P2.

Fraction étudiée	Polysaccharides A			Polysaccharides B		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Quantité (en mg) de sucres réducteurs libérés après 2h à 37° en présence de 1 mg de:						
- maltase	0	0	0	0	0	0
- β glucosidase	0,16	0,19	0,10	0,14	0,28	0,08
- β galactosidase	0	0	0	0	0	0

III) Polysaccharides des graines d'*Allium cepa*

Nous avons montré précédemment que les graines d'*Allium Cepa* et d'*Allium porum* contiennent des polysaccharides à mannose mais que ces " hémicelluloses " sont présentes en quantité moins importante que dans les graines d'*Endymion* ou d'*Asparagus*. C'est pourquoi l'étude des polysaccharides des graines d'Oignon a été nettement plus sommaire. Deux fractions A et B ont été extraites des graines d'*Allium cepa* en suivant le protocole expérimental qui avait été appliqué aux semences d'*Endymion*. Des masses assez faibles de ces deux fractions ont ainsi été isolées et nous nous sommes contentés d'étudier leur composition chimique. Comme le montre le tableau I4 la première fraction (A') contient encore une quantité non négligeable d'azote. Les deux fractions A' et B' ne libèrent, après hydrolyse acide, que 50% de substances réductrices et possèdent un rapport mannose/glucose voisin; le galactose est présent dans les deux cas. L'insoluble résiduel a une constitution semblable. Il est donc vraisemblable que les graines d'Oignon, comme celles d'Asperge, renferment des quantités assez importantes de glucomannanes (ces substances possédant dans le cas des graines d'Oignon un rapport M/G $\simeq$ 1,7).

Tableau 14: Détermination de la teneur en oses et en impuretés azotées des polysaccharides extraits des graines d'Oignon (fractions A et B)/

	Polysaccharides A	Polysaccharides B
<u>Teneur en azote</u> en mg pour 100 mg de la fraction	2,5	0
<u>Quantité de sucres réducteurs</u> (en mg. libérés après hydrolyse acide de 100 mg de polysaccharides.	51	52
<u>Composition en oses de chaque fraction</u> (valeurs exprimées en mg pour 100 mg d'oses libérés après hydrolyse acide)		
-glucose	32	35
-mannose	60	59
-galactose	8	6

Ces glucomannanes, si abondantes dans les graines de diverses Liliacées, existent certainement sous une forme figurée dans les cellules. Il convient donc maintenant d'étudier leur localisation.

C. Localisation des glucomannanes dans les cellules et étude de leur structure physique.

Les polysaccharides, si l'on excepte l'amidon, le glycogène ou l'inuline) sont souvent considérés comme des substances membranaires. Cependant, des chercheurs japonais(79) viennent de montrer dans les bulbes de certaines Orchidées l'existence de cellules spécialisées dans l'accumulation de mannanes. Il était donc intéressant d'effectuer des coupes au travers des graines, afin de déterminer les sites cellulaires occupés par les glucomannanes. De plus, si les analyses précédentes ont permis d'établir la composition chimique des polysaccharides, elles n'ont apporté aucun renseignement relatif à la structure physique de ces composés.

Afin de déterminer si les glucomannanes se trouvent sous une forme cristalline ou amorphe, deux sortes de technique vont être utilisées: d'une part, l'observation des hémicelluloses en lumière polarisée, d'autre part, l'analyse des spectres de diffraction de rayons X.

1°) Examen de coupes réalisées au travers de quelques graines

a) observation au microscope optique (planche I):

Les polysaccharides semblent bien ici, comme dans le cas des albumens des graines de Dattes (56) localisés au niveau des parois. Celles-ci, énormes, sont fréquemment interrompues par de très importantes ponctuations. Une coloration au rouge de ruthénium ne permet d'apercevoir qu'une lamelle moyenne, mince et très réduite, ce qui concorde avec les résultats des analyses chimiques.

De plus, les réactifs de la cellulose (chloroiodure de zinc et acide sulfurique iodé) sont pratiquement sans action sur ces parois.

b) observation au microscope électronique:

Afin d'étudier la surface des parois cellulaires, des coupes semi-fines sont réalisées, recueillies sur porte-objet recouvert de collodion, débarrassées du milieu d'inclusion et soumises aux techniques " d'ombrage métallique ". Sur les images ainsi obtenues, les parois apparaissent comme d'énormes masses extrêmement compactes. Les rares microfibrilles de cellulose n'ont pu être mises en évidence qu'à l'état dispersé, le plus souvent au niveau des communications intercellulaires. Ceci confirme les résultats des analyses chimiques qui laissaient prévoir des quantités très faibles de cellulose, la quasi totalité des polysaccharides se trouvant sous forme de glucomannanes. L'aspect compact des parois ne permettant pas de conclure à la présence ou à l'absence de microfibrilles, les coupes sont traitées à froid, pendant des temps variables, par l'eau oxygénée qui dénature progressivement la plupart des constituants cellulaires. Sur les parois apparaissent alors très nettement des fibrilles minces, longues, disposées suivant le grand axe de la cellule (planche III. N°1). Ces fibrilles ont une largeur comprise entre 100 et 300 Å et une longueur supérieure à 1μ . Dans certains cas, les fibrilles ne s'observent plus que sur des sortes de sillons parallèles (planche III. N°2). Les parois se sont donc constituées par des dépôts successifs de polysaccharides. Des fibrilles

de mannanes avaient d'ailleurs déjà été observées chez certaines algues (71).

Les parois ont également été étudiées en ultra-coupes. Les polysaccharides sont alors visualisés par l'action du protéinate d'argent sur des coupes traitées par le thiocarbohydrazide (TCH); après oxydation périodique (107). Un traitement ménagé par l'eau oxygénée démasque une texture fibrillaire (planche IV. N° 1). Sur des coupes réalisées au travers de graines de Jacinthe, des composés amorphes, peu abondants, semblent être associés aux fibrilles (planche IV. N° 2). MEIER avait déjà constaté la présence de deux sortes d'éléments différents dans les mannanes des graines de Dattes (72). Après coloration négative par l'acétate d'uranyle (planche IV. N° 3) apparaissent à l'intérieur des microfibrilles, des unités longues et très fines; ces " fibrilles unitaires " ont un calibre compris entre 10 et 40 Å. Elles s'apparient en ménageant une ligne médiane de 10 Å de large. Ces images rappellent celles déjà observées avec la cellulose (74) ou les polysaccharides de certaines Algues (82).

2°) Examen des glucomannanes en lumière polarisée...

Les images obtenues en lumière polarisée avec des coupes transversales de graines (planche II. N°1 N°2) permettent de conclure à une structure orientée des constituants membranaires. Si les glucomannanes purifiées sont observées en lumière polarisée, l'aspect est identique (planche II. N°3). Ce comportement en lumière polarisée peut être dû, soit à l'état cristallin des molécules de glucomannanes, soit simplement à l'agencement en fibres de ces molécules. L'analyse des spectres de diffraction de rayons X devrait apporter une réponse à ce problème.

3°) Analyse des spectres de diffraction de rayons X par polysaccharides.

Le diagramme a été obtenu sur un appareil C.G.R. avec tubes au cobalt. Les écarts réticulaires correspondant aux divers angles d'incidence ont été lus directement dans la table de Rose. Comme le montre la figure 21, les glucomannanes des graines d'Asperge sont sous forme cristallisée, car les écarts réticulaires satisfont à la loi de Bragg: $2 d \sin \theta = n \lambda$
avec d = écart de deux plans réticulaires.
 θ = angle d'incidence des rayons
 λ = longueur d'onde des rayons utilisés

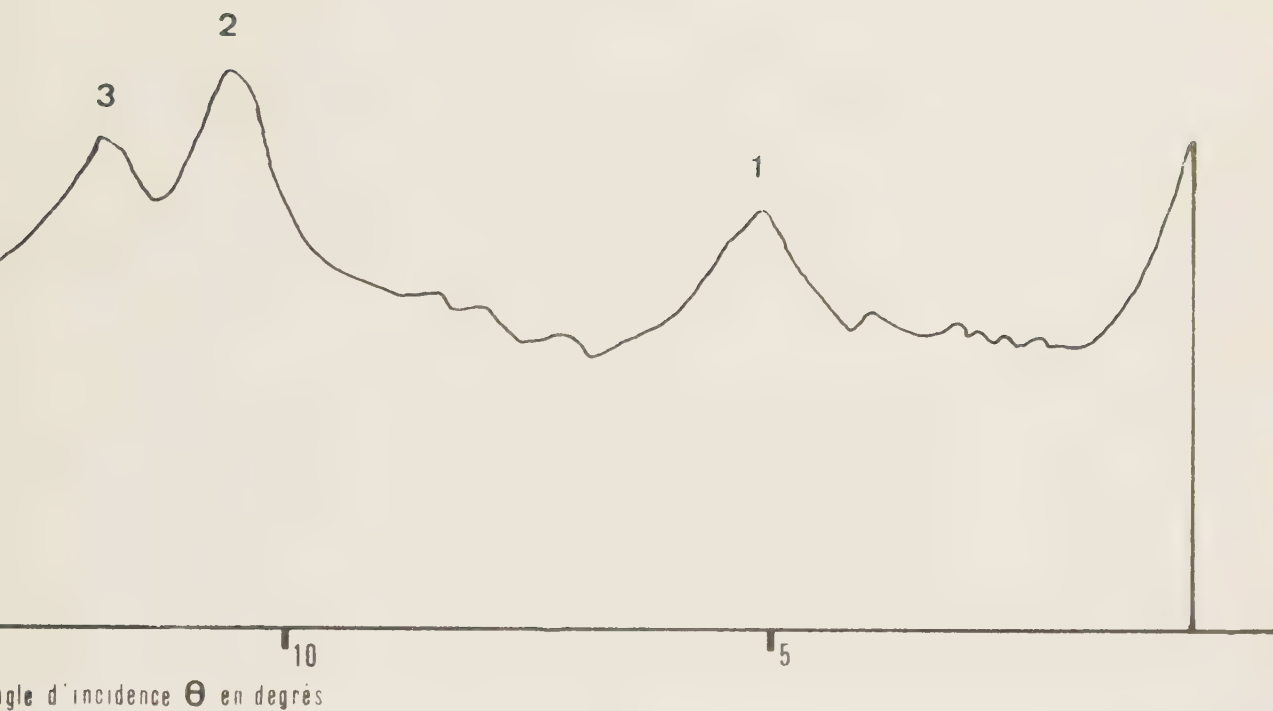


Fig. 2I: Spectre de diffraction des rayons X par des polysaccharides extraits des graines d'Asperge. (fraction B'₂).

N° des pics	Complément de l'angle d'incidence	Ecart réticulaire correspondant
I	5,2°	9,87 Å
2	10,5°	4,91 Å
3	11,9°	4,38 Å

Il est en effet frappant de constater que le premier pic à 9,90 Å correspond à un écart double de celui du pic suivant à 4,87 Å (à 0,5 % près); il est donc logique de supposer que nous sommes en présence des réflexions d'ordre 1 et 2 ($n=1$ et $n=2$) d'une famille de plans réticulaires de grande importance structurale. Le troisième pic (à 4,38 Å) correspond probablement à une autre famille de plans réticulaires. La valeur du premier pic est voisine de celle généralement admise pour le paramètre du monomère de la cellulose (10,3 Å). L'aspect général du diagramme rappelle les faits rapportés par KOOIMAN (61). Aucun spectre de diffraction n'a pu être réalisé avec les glucomannanes extraites des graines de Jacinthe par la soude 2N; celles extraites par la soude 5N diffractent faiblement les rayons X.

Le spectre est constitué par un ensemble de pics de hauteur réduite, correspondant à une série d'écarts réticulaires voisins de ceux obtenus par KOOIMAN et KREGER (61) avec les polysaccharides de diverses semences et qu'ils dénomment "spectre type *Palmaceae*", par analogie avec les figures publiées par MEIER lors de son étude des mannanes de Dattes.

CONCLUSION.

Les semences de Liliacées étudiées ici contiennent des polysaccharides constitués principalement par du glucose et du mannose. La structure de ces hémicelluloses est conforme à celle observée dans le cas de graines de familles très voisines (6): glucose et mannose reliés par leurs carbones 1 et 4, galactose à l'extrémité des molécules de polysaccharides. Le mannose et le glucose sont sous forme β ce qui semble être une constante des hémicelluloses des végétaux supérieurs (46, 101) (alors que les mannanes de Levure, par contre, sont constituées d' α mannose (84) mais le galactose, présent en plus faible quantité est sous forme α). Les liaisons 1 $\rightarrow$ 4 sont également très répandues parmi les polysaccharides végétaux. Une caractéristique des Liliales réside peut-être dans l'existence de grosses molécules linéaires (et non pas ramifiées comme les glucomannanes des tubercules de certaines Orchidées ou Aracées (28.79.89.98.99). Les graines d'Asperge, comme celles d'Oignon, semblent contenir un seul type de glucomannanes mais alors que les polysaccharides d'Asperge ont un rapport mannose/glucose = 1, ceux extraits des graines d'Oignon présentent un rapport mannose/glucose de l'ordre de 1,70. Les graines de Jacinthe, par contre, renferment deux types de glucomannanes différant entre eux par la valeur de ce rapport mannose/glucose (0,95 et 1,65).

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'EVOLUTION DES QUANTITES DES COMPOSES A MANNOSE ET DE LEUR NATURE AU COURS DE LA MATURATION ET DE LA GER- MINATION DE CERTAINES SEMENCES DE LILIACEES.

Après avoir montré, dans la première partie de ce travail, que certaines graines de Liliacées contiennent d'importantes quantités de glucomannanes localisées au niveau des parois cellulaires et après en avoir, autant que faire se peut, déterminé la structure, l'évolution de ces " hémicelluloses " va être suivie dans les diverses parties des semences au cours de la maturation et de la germination. Ce travail comprend deux types d'étude :

- l'histoire histologique et cytologique des organes en maturation et en germination
- l'étude quantitative et qualitative des diverses fractions glucidiques.

L'étude de la maturation a été menée sur les graines d'Endymion alors que l'étude de la germination a été faite sur les graines d'Asparagus.

A) Etude de la maturation des graines d'Endymion nutans.

Les fruits entiers (contenant les graines) sont récoltés à divers stades de maturation. Les semences sont alors retirées des fruits, et, capsules et graines sont étudiées séparément: à chaque stade, leur composition glucidique est déterminée afin de mettre en évidence les rapports pouvant exister entre les fruits et les graines. Sur des graines immatures, l'étude de la formation des glucomannanes est ensuite abordée en recherchant la présence de polymères de poids moléculaire intermédiaire et en tentant de préciser leur rôle éventuel. Enfin, l'étude histologique et cytologique des graines à divers stades de maturation permet de formuler des hypothèses quant à la nature des lieux de synthèse probables des glucomannanes.

1°) Evolution des diverses fractions glucidiques au cours-
de la maturation des graines d'Endymion nutans.

Les fractions glucidiques suivantes ont été étudiées:

- les glucides solubles dans les solutions hydroalcooliques,
- les glucides insolubles dans les solutions hydroalcooliques et entraînaibles par l'eau froide ou l'eau chaude.
- les " hémicelluloses ".

a) Evolution des quantités des diverses fractions glucidiques.

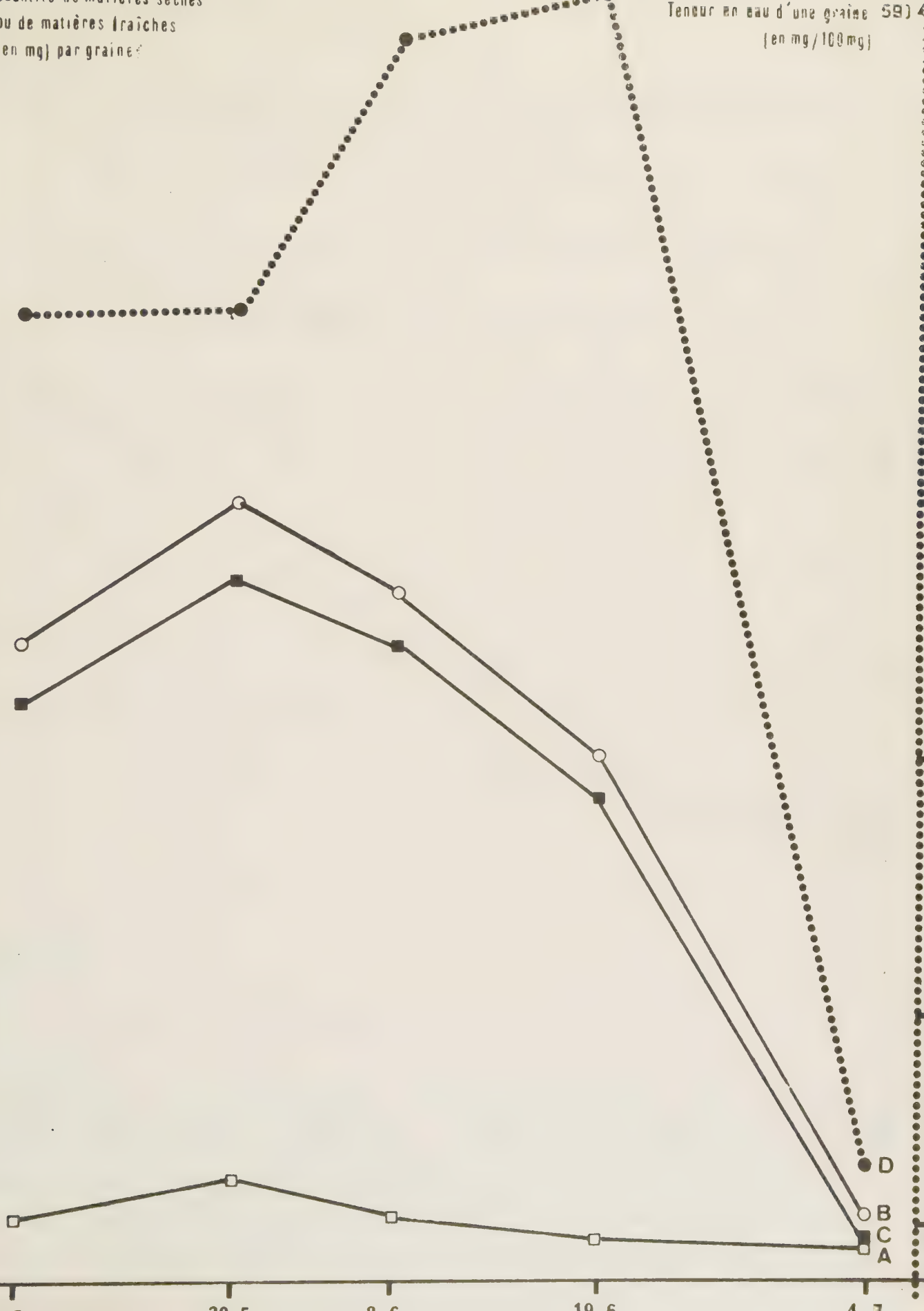
- α. Etude des capsules: les quantités d'eau et de matières sèches évoluent d'une façon analogue (fig 22): pendant une première phase le fruit s'accroît en volume et en poids puis, vient une deuxième période marquée par une très forte déshydratation (contemporaine de celle qui affecte les graines) et une diminution notable de la quantité de matière sèche. Ce schéma général est valable pour les glucides solubles comme pour les hémicelluloses (tableau I5). A la fin de la maturation, la capsule est fortement déshydratée elle contient alors beaucoup de substances insolubles (fig.23). ces substances représentent alors, près de 65% de la matière sèche.

Fig. 22: Evolution des capsules de Jacinthe au cours de la maturation

- A: Evolution du poids de matière sèche d'une capsule .
- B: Evolution du poids de matière fraîche d'une capsule.
- C: Evolution de la quantité d'eau contenue dans une capsule.
- D: Evolution de la teneur en eau (en mg pour 100 mg de matière sèche)

ou de matières sèches
(en mg) par graine

Teneur en eau d'une graine 59)
(en mg/100mg)



quantité de substances insolubles (en mg)

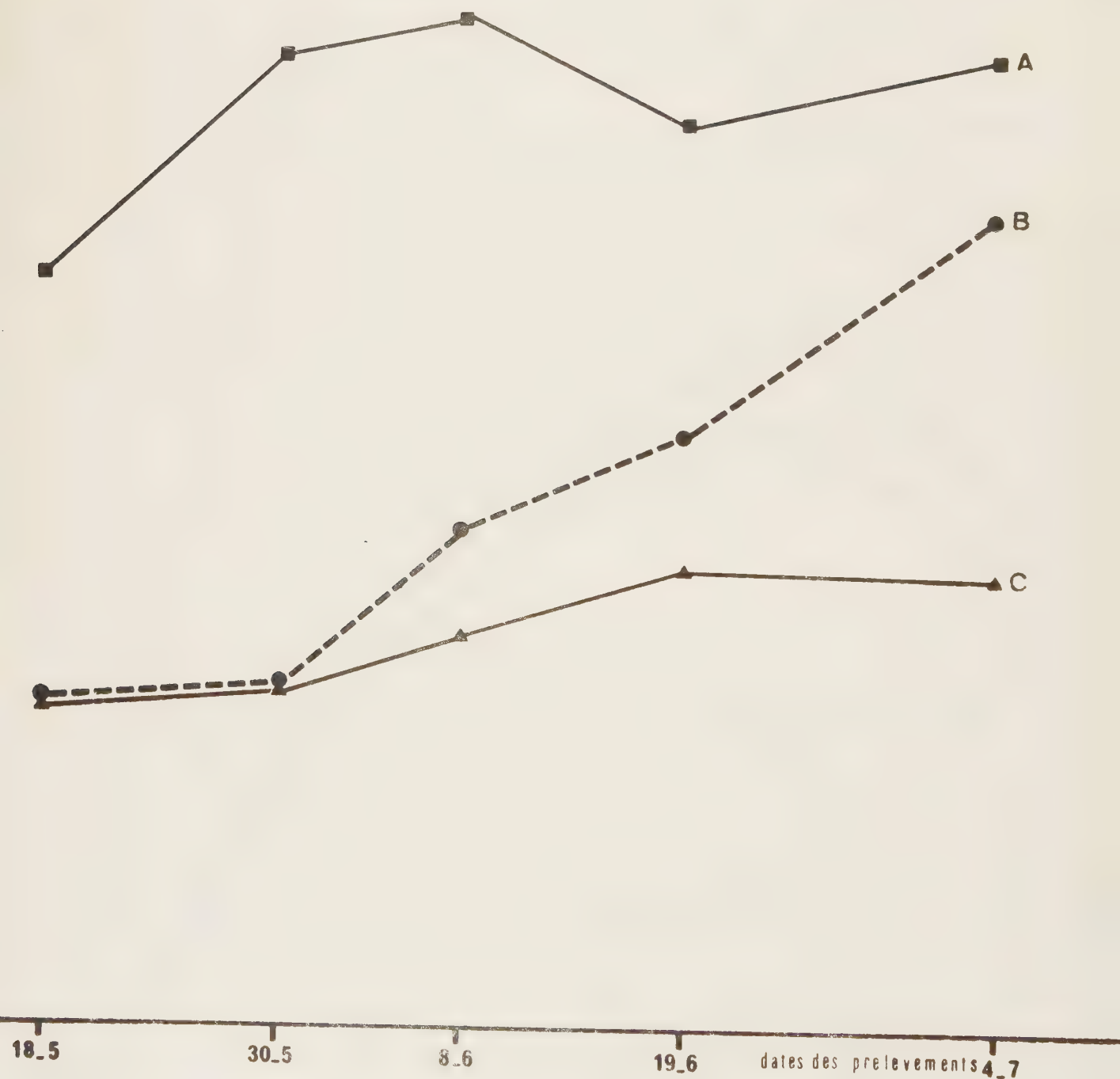
quantité de substances insolubles
(en mg pour 100 mg de matières
sèches)

Fig. 23: Evolution des substances insolubles au cours de maturation des capsules de Jacinthe.

Les résultats sont exprimés en mg :

-A: par capsule.

-B: pour 100 mg de matières sèches.

bleau 15: Evolution quantitative des diverses fractions glucidiques des graines et fruits de Jacinthe au cours de la maturation.

Les stades 1.2.3.4.5. correspondent respectivement aux prélèvements effectués les 18.5, 30.5, 8.6, 19.6, et 4.7.

Les résultats sont rapportés à un organe (graine ou capsule) ou à 100 mg de substances sèches.

Les quantités de polysaccharides et d'oligosides sont exprimées en mg de glucides réducteurs libérés après hydrolyse acide.

Stade étudié	Graines					Capsules				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<u>Glucides réducteurs libérés</u>										
en mg par organe	0,012	0,030	0,020	0,017	0,002	2,2	3,9	3,1	0,7	0,05
en mg pour 100 mg de substances sèches	4,7	6,4	1,1	0,7	0,07	9,4	13,6	15,2	4,6	0,45
<u>Oligosides</u>										
<u>solubles.</u>										
en mg par organe	0,034	0,066	0,180	0,103	0,095	1,52	3,23	3,66	1,45	0,21
en mg pour 100 mg de substances sèches	13,8	14,0	9,8	13,2	2,6	6,4	11,2	17,9	9,6	1,7
<u>Polysaccharides</u>										
<u>traités par eau froide</u>										
en mg par organe	0,004	0,007	0,041	0,053	0,20	0,49	0,67	0,96	0,37	0,20
en mg pour 100 mg de substances sèches.	0,6	1,5	2,2	2,1	0,6	2,1	2,3	4,7	2,5	1,7
<u>Micelluloses</u>										
en mg par organe	0,006	0,015	0,135	0,94	1,68	1,01	1,22	1,68	1,39	1,36
en mg pour 100 mg de subs.sèches	2,4	3,3	7,3	37,1	47,1	4,2	4,2	8,2	9,3	11,3

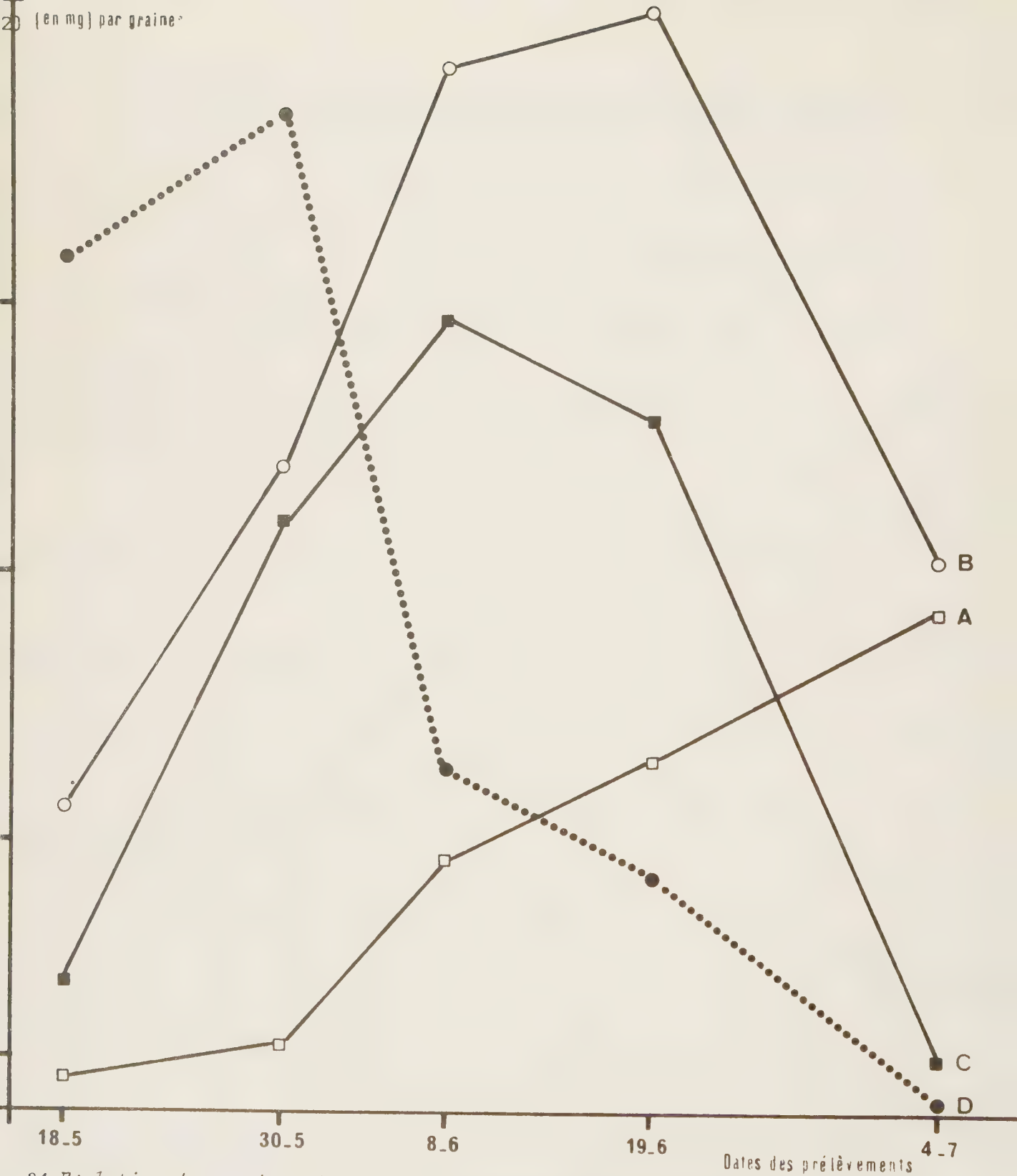


Fig. 24: Evolution des graines de Jacinthe au cours de la maturation.

- A: Evolution du poids de matières sèches d'une graine.
- B: Evolution du poids de matières fraîches d'une graine.
- C: Evolution de la quantité d'eau contenue dans une graine.
- D: Evolution de la teneur en eau d'une graine (en mg. pour 100 mg. de substances sèches.)

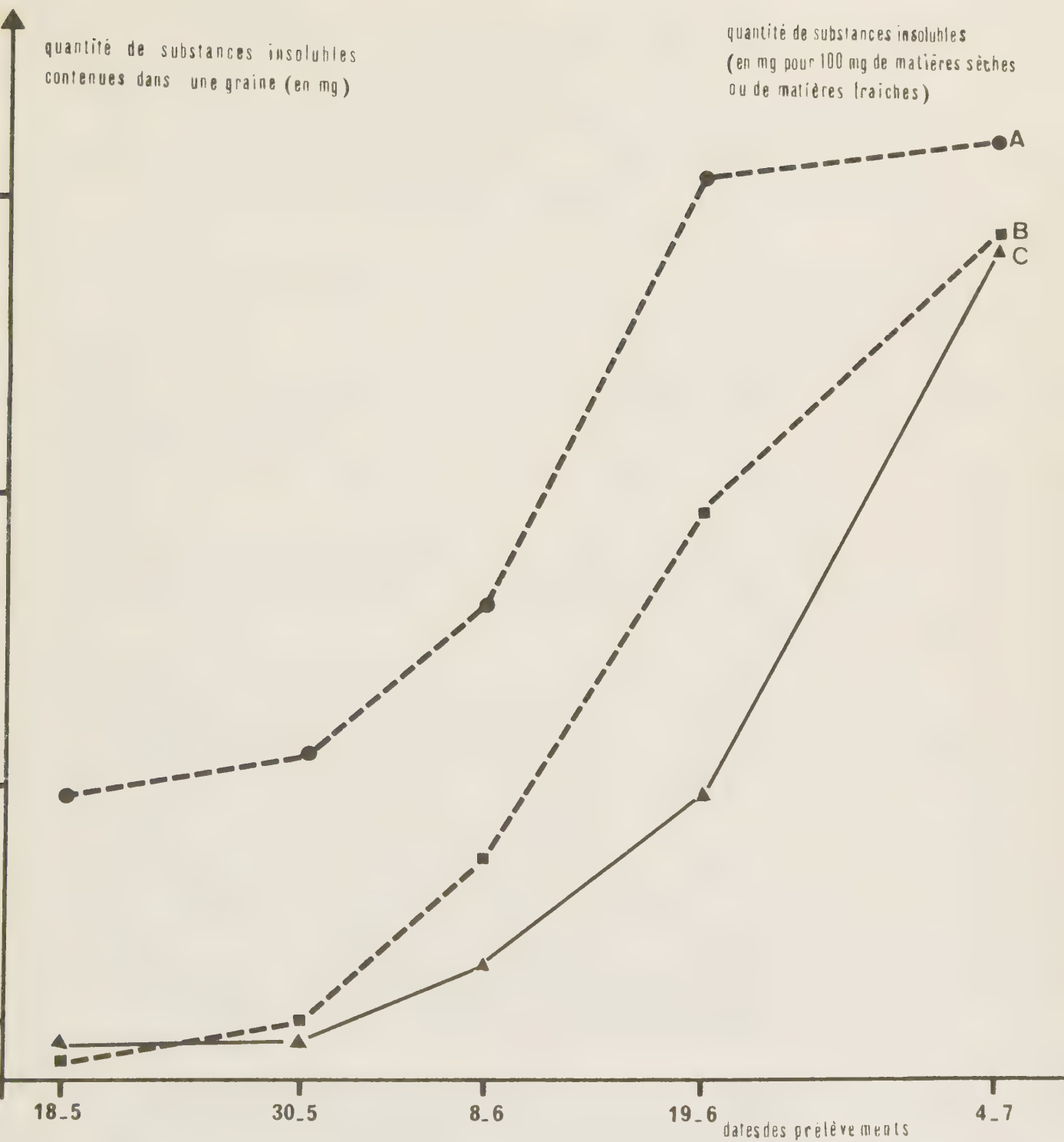


Fig. 25: Evolution des substances insolubles au cours de la maturation des graines de Jacinthe.

Les résultats sont exprimés en mg.:

A : pour 100 mg. de matières sèches.

B : par graine.

C : pour 100 mg. de matières fraîches.

- β- Etude des graines. La quantité d'eau contenue dans les graines s'élève, au cours de la croissance et du développement des semences, pour diminuer brutalement en fin de maturation. (fig. 24) Le poids des substances sèches contenues dans une graine augmente très fortement au cours de la maturation. Cette augmentation est due essentiellement à l'accumulation de substances insolubles et, plus précisément d'hémicelluloses (fig. 25). La quantité de glucides solubles évolue parallèlement à la quantité d'eau (tableau I5).

b) Evolution de la composition des diverses fractions glucidiques (tableau I6).

- ✓ Glucides solubles: La chromatographie sur papier des solutions hydroalcooliques extraites des graines et des fruits révèle une composition apparemment invariable tout au long de la maturation: glucose, fructose, saccharose et une série d'oligosides sont présents dans les graines comme dans les fruits.

Si les solutions hydroalcooliques subissent une hydrolyse acide suivie d'une silylation, la chromatographie en phase gazeuse des dérivés silylés apporte une série de résultats supplémentaires:

- les glucides solubles des capsules ne sont constitués que de fructose et de glucose (le galactose n'est présent qu'à l'état de traces). Les oligosides observés sur les chromatogrammes étaient donc vraisemblablement des oligofructosides. Le rapport fructose/glucose varie peu au cours de la maturation;
 - les glucides solubles des graines, par contre, forment un ensemble nettement plus hétérogène : outre du glucose et du fructose, l'hydrolyse acide libère également du rhamnose et de faibles quantités de galactose, xylose et mannose. Le rhamnose, relativement abondant, pourrait provenir de l'hydrolyse d'un hétéroside. Le rapport fructose/glucose augmente au cours de la maturation; ceci est probablement en rapport avec la synthèse d'oligofructosides.
- β- Polysaccharides entraînaibles par l'eau (tableau I6)
Seule, a été déterminée la composition des polysaccharides entraînaibles par l'eau froide. Ces glucides gardent une composition très différente dans les graines et les fruits tout au long de la maturation.

Tableau 16: Evolution de la composition des polysaccharides des graines et des capsules d'Endymion au cours de la maturation.

Les stades 1,2, 3,4,5 correspondent respectivement aux prélèvements effectués les 18.5,30.5,8.6,19.6 et 4.7

Les résultats expriment les pourcentages des différents oses constitutifs des diverses fractions glucidiques.

Organe étudié	Graines					Capsules				
Stade étudié	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<u>Monosaccharides extraits</u>										
<u>Polysaccharoïde</u>										
- arabinose	18	11	3	4	3	42	41	14	14	15
- xylose	7	8	0	0	0	18	16	6	6	25
- galactose	13	17	10	8	7	24	22	9	7	12
- glucose	58	61	73	68	68	16	21	71	72	36
- mannose	4	3	14	20	22	0	0	0	0	12
<u>Glucelluloses</u>										
- arabinose	33	13	11	1	0	9	11	13	15	20
- xylose	11	8	4	0	0	17	44	49	52	61
- galactose	17	33	8	4	3	30	18	17	16	5
- glucose	35	39	54	58	44	36	25	18	15	11
- mannose	4	7	23	36	53	8	2	3	2	4

Dans les capsules, l'arabinose, abondant dans les premiers stades, ne représente plus, dans la deuxième partie de la maturation que 14% de l'ensemble des monosaccharides obtenus après hydrolyse acide. Le glucose, par contre, suit une évolution inverse. Le dernier stade se distingue de plus, par une teneur relativement élevée en xylose.

Dans les graines, le glucose demeure le constituant principal; la quantité de mannose, faible dans les graines jeunes devient importante dans les graines mûres. La composition des polysaccharides, hétérogène au départ, tend à se simplifier. Ces polysaccharides sont en réalité, comme nous le verrons plus loin, un mélange de plusieurs polymères glucidiques.

5 Hémicelluloses (40)

Dans les capsules, les "hémicelluloses" s'enrichissent régulièrement en xylose et s'appauvrissent relativement en glucose.

Dans les graines jeunes, les "hémicelluloses" forment un ensemble extrêmement hétérogène et assez proche des hémicelluloses des capsules : arabinose, xylose, glucose et galactose assez abondants, mais très peu de mannose (tableau I6). Au cours de la maturation, leur composition se simplifie notablement: les graines mûres ne contiennent que du glucose et du mannose, avec de très faibles quantités de galactose.

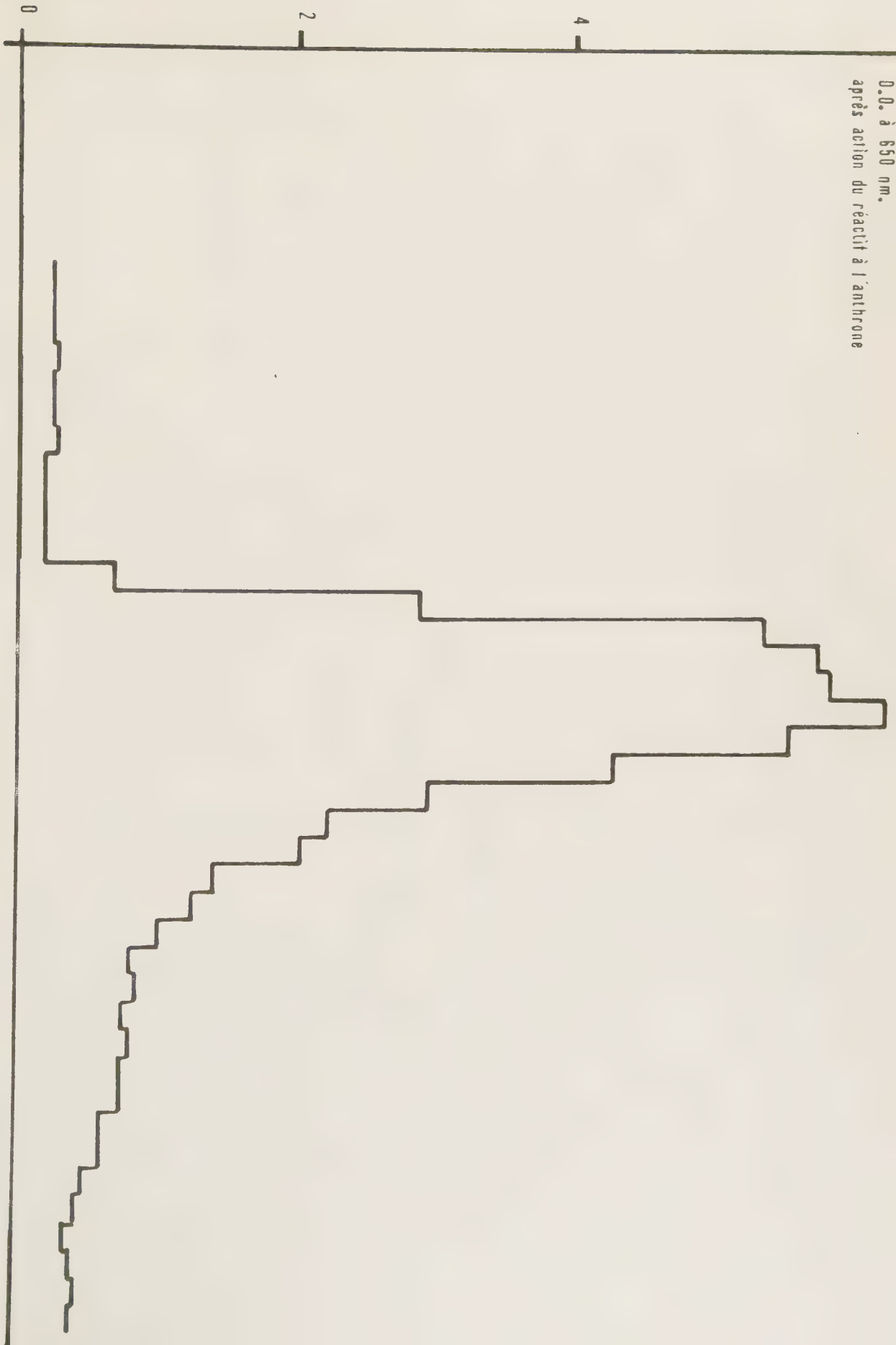
Tout au long de la maturation, graines et fruits constituent donc deux entités distinctes, évoluant d'une façon indépendante, leur seule caractéristique commune résidant dans la déshydratation qui se produit en fin de maturation. Il est intéressant de constater que la composition des polysaccharides des graines évolue constamment: très hétérogène au départ, ces substances se limitent à un "mélange" de glucose et de mannose dans les graines mûres. Afin de préciser les mécanismes intervenant dans cette accumulation, nous avons recherché dans des graines immatures la présence de glucides solubles de poids moléculaire intermédiaire.

2°) Recherche de la présence et du rôle de composés de poids moléculaire intermédiaire.

On admet depuis quelques années (10.13) que la synthèse des polysaccharides s'effectue par l'intermédiaire de "nucléotides sucres", ces composés apportant la molécule de monosaccharide qui sera ajoutée à un chaînon glucidique, l'augmentant ainsi d'une unité. Il se pourrait donc qu'existent dans les graines immatures des polysaccharides de poids moléculaire faible et voisins, quant à leur composition chimique, des "hémicelluloses"; c'est pourquoi nous avons étudié les deux points suivants:

- la composition des polysaccharides entraînables par l'eau froide,
- l'incorporation de molécules marquées dans les diverses fractions glucidiques.

0.0. à 650 nm.
après action du réactif à l'anthrone



fractions glucidiques éluées

Fig. 26A: Filtration sur gel Séphadex G 25 de la fraction hydrosoluble extraite des graines de Jacintie
au stade IV de la maturation.

U. 2. a 650m.
après action du réactif à l'anthrone

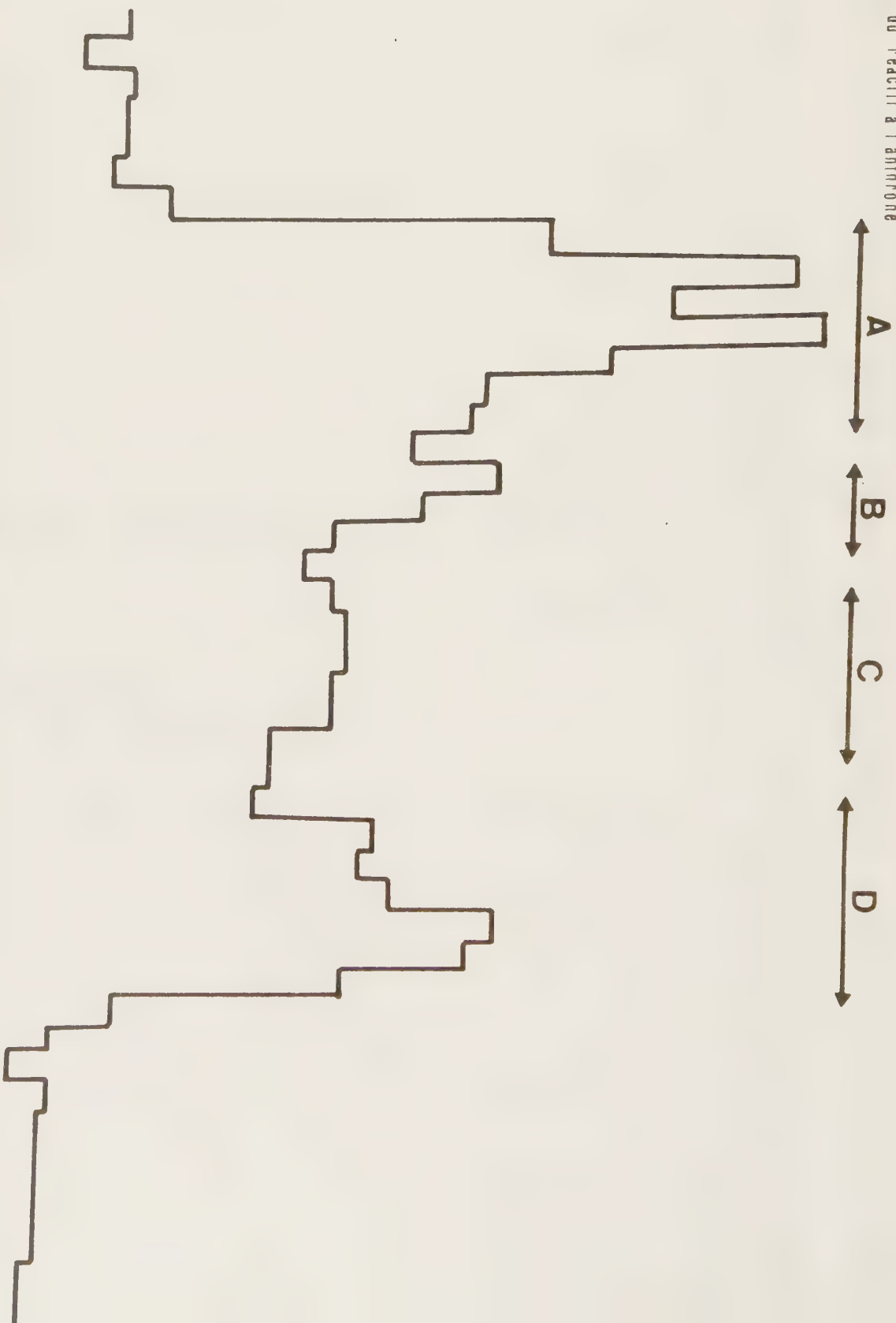


Fig. 26 B : Filtration sur gel Sephadex G 75 de la fraction hydrosoluble extraite des graines de jacinthe au stade I de la maturation.

Fractions glucidiques éluées

a) Etude des polysaccharides entraînables dans l'eau froide.

Les analyses sont effectuées sur un extrait aqueux obtenu à partir de graines en cours de maturation (stade 4). Une partie de cet extrait subit un tamisage moléculaire sur gel Sephadex. Les principales fractions glucidiques ainsi séparées sont concentrées, hydrolysées, neutralisées, silylées, puis analysées par chromatographie en phase gazeuse. On obtient alors une série de polysaccharides différant par leur poids moléculaire (fig. 26A et B). Une des fractions ainsi séparée possède une composition très voisine de celle des " hémicelluloses " du même stade (tableau I7). Il semble donc que les graines immatures contiennent de très faibles quantités de polysaccharides voisins des hémicelluloses " insolubles " dont ils ne diffèrent que par la valeur de la masse moléculaire.

Tableau I7: Composition des fractions obtenues après tamisage moléculaire moléculaire (S/gel G 75) des polysaccharides (des graines d'Endymion) entraînables par l'eau froide (stade 4, fraction

M₄α)

Sur ce tableau ont été rapportées les compositions des fractions suivantes:

- A.B.C.D.: fractions glucidiques séparées par tamisage moléculaire de la solution;
- M₄α fraction glucidique extraite par l'eau froide, de graines du stade 4;
- hémicelluloses insolubles: composition en oses de la fraction " hémicelluloses " des graines au stade 4.

Les résultats expriment les pourcentages des différents oses constitutifs des diverses fractions **glucidiques** étudiées.

Fraction étudiée	A	B	C	D	Hémicelluloses insolubles	<u>M₄α</u> brut
Arabinose	6	1	2	3	1	4
Galactose	10	8	5	5	4	8
Glucose	75	62	59	65	58	68
Mannose	9	29	34	27	36	20
Mannose/glucose	0,12	0,47	0,58	0,42	0,61	0,30

b) Etude de l'incorporation de glucides radioactifs:---

Des graines immatures sont retirées des capsules et laissées 30 minutes dans 4 ml d'eau contenant $0,25 \mu\text{M}$ de glucose $1.14.\text{C}$ ou de mannose $1.14.\text{C}$ (activité spécifique 20 mc/mM). Après rinçage par de l'eau déminéralisée, les graines restent des temps variés (30 minutes, 2h, 5h) dans de l'eau. Les fractions glucidiques habituelles sont alors extraites et leur radioactivité déterminée dans un compteur à scintillation (Packard). Une fraction de chacune des solutions hydroalcooliques est chromatographiée sur papier et la radioactivité des glucides ainsi séparés est mesurée directement dans un compteur (RA 12). Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux I8 et I9, les faits suivants peuvent être ainsi constatés:

- le glucose, comme le mannose, sont incorporés inégalement dans les diverses fractions glucidiques. La majeure partie de la radioactivité se retrouvant dans la fraction hydroalcoolique.
- la radioactivité des sucres solubles se répartit différemment suivant la durée du séjour dans l'eau distillée après la période d'introduction de l'ose marqué: ainsi, le saccharose devient de plus en plus radioactif. Les oligofructosides présentent toujours une faible activité (tableau I9).
- le pourcentage de radioactivité incorporée dans les substances insolubles augmente avec le temps de séjour des graines dans l'eau distillée, après la période d'introduction de l'ose marqué.
- la radioactivité incorporée dans les fractions hydrosolubles est assez faible et évolue peu, sauf dans un cas (tableau I8)
- l'activité spécifique des glucides " entraînaibles par l'eau", après élimination des oligosides solubles, est par contre relativement élevée.

Cette activité spécifique élevée des fractions " hydrosolubles " (activité nettement plus forte que celle de l'"insoluble") permet de supposer que ces fractions contiennent peut-être des substances jouant le rôle de composés intermédiaires dans la voie de la synthèse des polysaccharides insolubles.

Tableau 18 Absorption de glucose et de mannose radioactifs par des graines immatures de Jacinthe.

Les graines séjournent 30 mn dans une solution de mannose ou de glucose radioactifs (5μ C) puis restent des temps plus ou moins longs dans de l'eau (30mn -2h -5h-)

Dans chacun des cas, la radioactivité des fractions glucidiques suivantes est déterminée:

- A) fraction hydroalcoolique
- B) fraction extraite par l'eau froide après le traitement précédent.
- C) fraction extraite par l'eau chaude, après les traitements précédents.
- D) " insoluble " dans les solvants précédents.

Nature du glucide * introduit	G l u c o s e * x				M a n n o s e * x			
Fraction étudiée	A	B	C	D	A	B	C	D
Radioactivité des diverses fractions:								
a) en cps/ mn:								
durée du séjour dans l'eau								
30 mn	48546	370	290	57	55056	481	336	68
2 h	37850	370	200	175	31395	182	279	163
5 h	41454	362	176	292	34454	250	280	269
b) en ‰ de la radioactivité totale " absorbée "								
durée du séjour dans l'eau								
30 mn	985	8	6	1	984	9	6	1
2 h	980	10	5	5	980	6	9	5
5 h	980	9	4	7	980	6	7	7
Radioactivité spécifique de chaque fraction en cps/mn/mg de glucide								
l'activité de la fraction A								
avant ramenée à 1000 cps/mn/mg								
durée du séjour dans l'eau								
30 mn	1000	250	179	10	1000	244	183	11
2 h	1000	270	158	49	1000	161	250	55
5 h	1000	242	128	69	1000	163	198	67

Tableau I9: Distribution de la radioactivité dans les différents glucides solubles.

Des graines immatures ont été laissées 30 mn dans une solution radioactive ($5\mu\text{C}$ de glucose ou de mannose) puis lavées et gardées des temps variables (30mn, 2h, 5h) dans l'eau. Les glucides solubles extraits par des solutions hydroalcooliques sont séparés par chromatographie sur papier.

Les activités des divers glucides solubles sont exprimées en % de la radioactivité de l'ensemble des glucides solubles du chromatogramme.

Nature du glucide * introduit	Glucose *			Mannose *		
Durée du séjour dans l'eau	30mn	2h	5h	30mn	2h	5h
<u>Activité des divers glucides</u>						
Mannose + fructose	11	17	30	82	64	41
Glucose	76	67	50	10	24	35
Saccharose	6	9	10	6	8	18
Oligosides	7	7	10	2	3	6

3°) Etude histologique et cytologique des graines au cours de la maturation.

A) au microscopique optique : Des coupes transversales sont pratiquées sur des graines à divers stades de maturation; les polysaccharides sont colorés par le réactif de Mac Manus (acide périodique- Schiff). Les graines présentent un aspect caractéristique avec des files de cellules rayonnant à partir de l'embryon, image en tous points comparable à celles de la maturation des graines d'Asperge (91), (planche V N° I). Les graines immatures très jeunes possèdent un albumen constitué de cellules à parois minces avec, de place en place, quelques épaississements à partir desquels commencent à se former des membranes secondaires (planche V). Ainsi, se constitue au sein de l'albumen, une sorte de " grillage "; au cours de la maturation, toutes les

régions de l'albumen sont atteintes par ce phénomène. Les " zones de dépôt " deviennent de plus en plus proches les unes des autres et toutes les cellules finissent par être ainsi " encerclées ". De nombreuses ponctuations interrompent les membranes. Dans les cellules, l'amidon est rare, mais les gouttelettes lipidiques abondent.

- b) Au microscope électronique: Les polysaccharides végétaux ne sont pas décelables, en microscopie électronique, par les moyens habituels de fixation et de coloration. La formation des parois squallettiques n'a pu être étudiée, jusqu'à présent, que par des méthodes indirectes. Récemment, plusieurs techniques cytochimiques ont été proposées pour mettre en évidence les polysaccharides au niveau des ultrastructures. Nous avons utilisé la méthode de THIERY (107) (oxydation périodique, et la thiocarbohydrazide (TCH)-protéinate d'argent). Sur des coupes ainsi traitées, le microscope électronique permet de constater à nouveau l'existence de " plages " de membranes secondaires, souvent situées au niveau des méats. De plus, les polysaccharides semblent présents sous la forme de microfibrilles (planche VI). Si l'alignement des microfibrilles est apparent dans les parois jeunes, en fin de maturation, lors de la déshydratation, les parois deviennent compactes et il est alors impossible de distinguer une quelconque organisation à ce niveau. Enfin, un fait intéressant réside dans l'évolution des lieux probables de synthèse des polysaccharides au cours de la maturation. Dans les graines jeunes, les cellules ne possèdent qu'un appareil de Golgi très réduit dont les vésicules sont exemptes de polysaccharides; la membrane ectoplasmique présente un grand nombre de replis délimitant ainsi de petites anfractuosités au sein desquelles apparaissent des éléments figurés qui pourraient être des polysaccharides (planche VI). Dans les coupes au travers de graines plus âgées, au contraire, ces replis sont moins importants, mais l'appareil de Golgi devient très apparent avec de nombreuses vésicules remplies de polysaccharides (planches VIII et IX). Ces vésicules migrent vers la périphérie de la cellule et semblent se vider de leur contenu au contact de la paroi (planche IX). Les lieux de synthèse seraient donc de deux sortes: d'une part, au contact même de la membrane squallettique en voie d'édification dans des " creux " limités par la membrane plasmique (ce qui rappelle les faits observés par BUVAT (19) puis par J.C. ROLLAND (92.94), d'autre part, dans les vésicules golgiennes qui " véhiculeraient " ensuite les polysaccharides jusqu'à la membrane cellulaire.

Si le rôle de l'appareil de Golgi, en tant que lieu de synthèse des polysaccharides membranaires, est déjà connu depuis quelques années (86.114), l'intervention de certains points de la membrane ectoplasmique vient d'être rapportée dernièrement par VILLEMEZ et ses collaborateurs (111.112). Etudiant l'activité synthétisante des diverses fractions cellulaires obtenues par centrifugation différentielle, ces auteurs ont constaté que la fraction contenant les membranes ectoplasmiques présentait l'activité maximale, alors que la fraction correspondant à l'appareil de

Golgi ne possédait qu'une activité synthétisante réduite. Il se pourrait donc que, suivant les tissus ou l'état physiologique des cellules, la synthèse des polysaccharides s'effectue dans les vésicules Golgiennes ou à l'extérieur de la membrane ectoplasmique contre la paroi déjà existante.

CONCLUSION.

Au cours de la maturation, graines et fruits évoluent suivant des métabolismes différents. L'apport des fruits se fait vraisemblablement sous forme de petites molécules (fructose, glucose, saccharose) qui seront transformées à l'intérieur des graines. Tant que les graines renferment encore suffisamment d'eau, les glucides " solubles " sont relativement abondants. Au moment de la déshydratation, ces substances disparaissent et seuls subsistent les polysaccharides insolubles synthétisés durant la maturation. Dans les graines très jeunes, les cellules de l'albumen ne sont limitées que par une membrane primaire mince, de constitution très hétérogène. Puis, se déposent par endroits, des polysaccharides d'un type différent (à base essentiellement de glucose et de mannose). Cette membrane secondaire, constituée par des microfibrilles de glucomannanes, se développe intensément et finit par encercler toutes les cellules de l'albumen; elle représente alors la quasi-totalité des parois cellulaires (la membrane primaire n'occupant qu'une surface très restreinte). Les glucomannanes qui s'accumulent ainsi au cours de la maturation sont synthétisées dans des replis de la membrane ectoplasmique dans les graines jeunes, puis vraisemblablement dans l'appareil de Golgi. Au cours de cette synthèse, il se pourrait que soient d'abord formées des molécules glucidiques de moindre poids moléculaire; l'intervention de ces substances " prémembranaires " a d'ailleurs été envisagée par divers auteurs (93.102) En fin de maturation, les glucomannanes parviennent à constituer près de 50% de l'ensemble des matières sèches des graines. L'évolution de ces substances au cours de la germination va maintenant être étudiée.

B) Etude de la germination des graines d'Asparagus officinalis.

L'étude qualitative des polysaccharides des graines d'Asperge et de Jacinthe a été suivie de la recherche de l'évolution de ces substances au cours de la maturation des graines. C'est maintenant l'évolution de ces composés lors du déroulement de la germination qui va être étudiée. A différents stades vont être déterminées, d'une part les quantités des diverses fractions glucidiques présentes dans les organes de réserve (albumen plus cotylédon) et dans les " parties axiales " (épicotyle plus radicule) nouvellement formées, d'autre part, la composition de ces fractions. Enfin, l'étude histologique et cytologique de plusieurs stades de la germination apporte des renseignements complémentaires sur la localisation des phénomènes intervenant au cours de la germination.

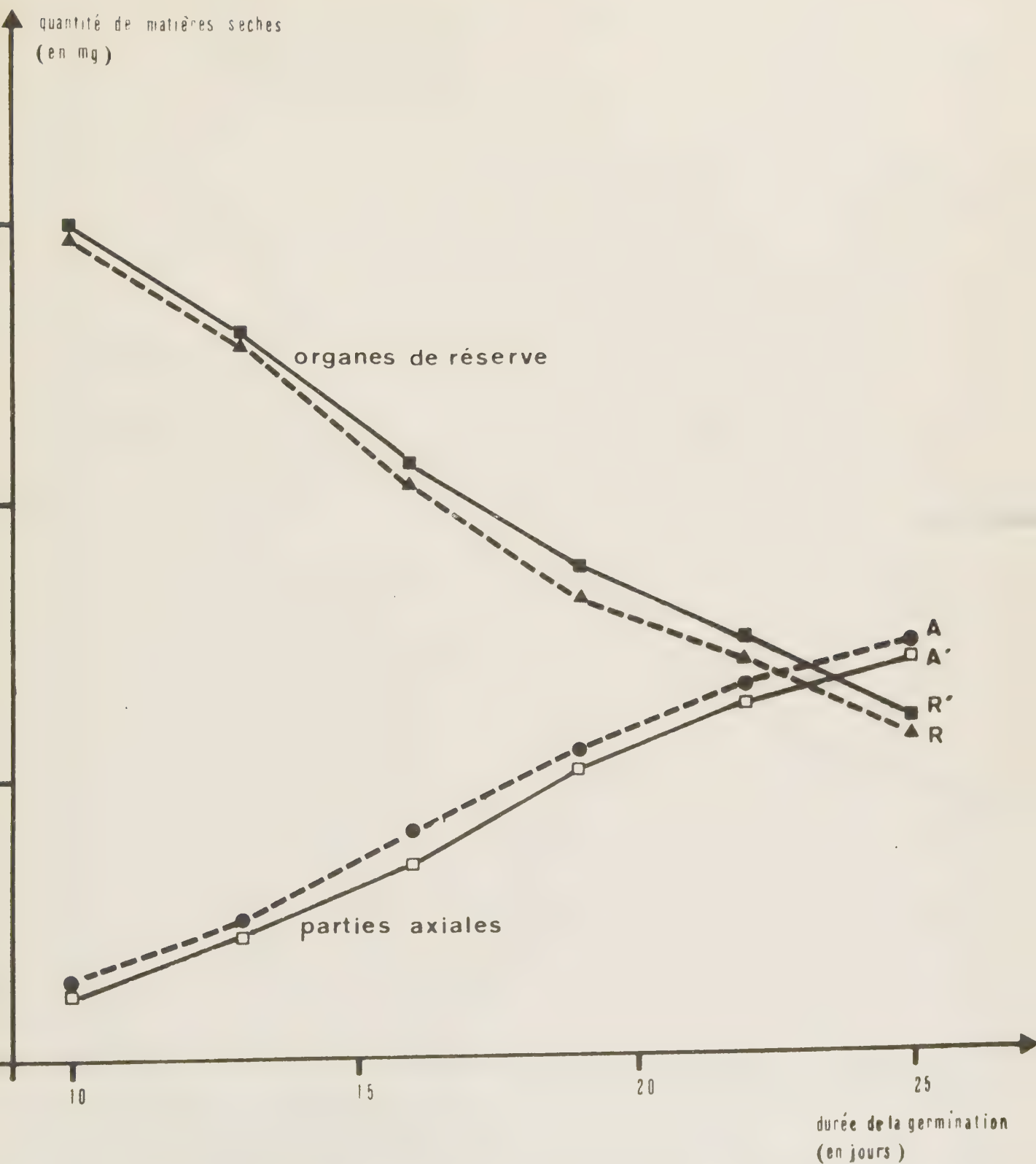


Fig. 27 : Evolution du poids de matière sèche au cours de la germination des graines d'

a - germination à l'obscurité : R = organes de réserve
A = parties "axiales"

b - germination à la lumière : R' = organes de réserve
A' = parties "axiales"

Teneur en eau des "parties axiales"
(en mg/100mg de matières sèches)

Teneur en eau des "organes de réserve"
(en mg/100mg de matières sèches)

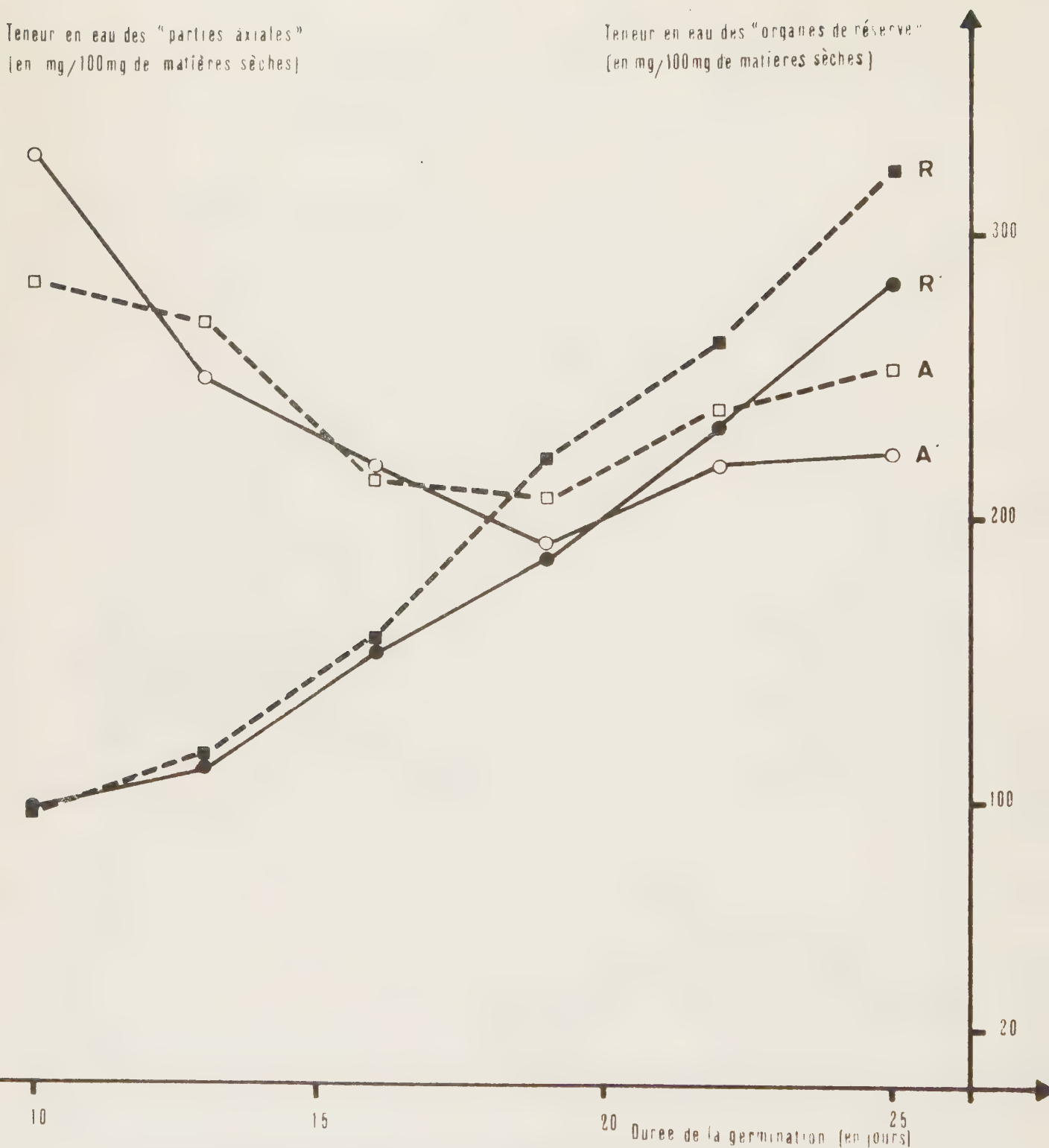


Fig. 28 : Gémination des graines d'Asperge : évolution de la teneur en eau.

Les résultats (en mg) sont rapportés à 100 mg de matières sèches.

1 °) Evolution de la quantité et de la composition de diverses fractions glucidiques.

a) Protocole expérimental.

En vue de leur stérilisation, les graines d'Asperge sont placées 30mn dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10%, puis abondamment rincées, ~~et~~ mises à germer sur du papier imbibé d'eau déminéralisée dans une étuve obscure à 23°C. Après 7 jours passés dans ces conditions, une partie des cultures est disposée sous des tubes luminescents (10 000 lux). A intervalles réguliers, 200 semences sont prélevées, ~~les~~ organes de réserve et les parties axiales sont séparés et fixés dans de l'alcool à 96°. Comme précédemment, les fractions glucidiques suivantes ont été étudiées:

- les glucides " solubles " (dans les solutions hydroalcooliques),
- les polysaccharides entraînables dans l'eau froide et dans l'eau chaude,
- les " hémicelluloses "

b) Evolution générale des semences au cours de la germination.

Au cours de la germination, à la lumière, comme à l'obscurité les " parties axiales " se développent et les quantités des diverses fractions glucidiques, solubles ou insolubles, augmentent (tableau 20, fig. 27). Les organes de réserve, par contre, s'imbibent et voient disparaître progressivement l'ensemble de leurs constituants (fig.28). La diminution du poids de matières sèches des organes de réserve est due essentiellement à la perte des hémicelluloses. En effet, non seulement la quantité d'hémicelluloses contenues dans l'albumen plus 1 cotylédon diminue, mais également la quantité d'hémicelluloses rapportée à 100 mg de matières sèches (fig.29) et 30). Les hémicelluloses membranaires représentent donc la principale substance de réserve des semences d'Asperge. L'évolution quantitative et qualitative des diverses fractions glucidiques va maintenant être précisée, afin de tenter de dégager les relations s'établissant entre ces fractions au cours de la germination.

c) Evolution des " glucides solubles " (en milieu hydroalcoolique)

Les teneurs en sucres solubles sont déterminées par deux méthodes différentes ce qui permet de comparer les deux techniques utilisées

- par dosage colorimétrique suivant la technique de NELSON SOMOGYI avant et après hydrolyse acide. Peuvent être ainsi estimées les quantités de sucres réducteurs libres et de glucides solubles " liés " dans des composés de type oligoside ou hétéroside.

Tableau 20: Evolution des quantités de glucides solubles(en solution hydroalcoolique: oligosides) et insolubles au cours de la germination des graines d'Asperge.

Les quantités de glucides sont exprimées en mg de substances réductrices libérées après hydrolyse acide.

Les résultats (en mg) sont rapportés à 100 organes (parties axiales ou organes de réserve) ou à 100 mg de substances sèches.

Organes étudiés	Parties axiales							Organes de réserve						
	10	13	16	19	22	25		10	13	16	19	22	25	
A. Germination à la lumière														
-quantité de glucides solubles														
• en mg pr 100 organes	29,9	54,7	101,4	145,6	187,2	169		71,4	83,2	127,4	153,4	132,6	130	
• en mg pr 100 mg de substances sèches	27,2	25,4	29,8	28,5	29,7	23,8		4,9	6,4	11,9	17,4	17,9	21,0	
-quantité de glucides insolubles														
• en mg pr 100 organes	3,8	14,4	26,0	36,8	46,0	51,3		544,5	418	305,2	197,7	161,6	118,2	
• en mg pour 100 mg de substances sèches	3,4	6,7	7,6	7,2	7,3	7,2		36,3	31,9	28,4	22,4	21,9	19,1	
B. Germination à l'obscurité														
- quantités de glucides solubles														
• en mg pr 100 organes	36,0	75,4	158,6	174,2	200,2	228,8		70,3	76,9	125,8	150,8	144,5	130,0	
• en mg pr 100 mg de substances sèches	25,3	31,4	39,8	32,2	30,6	31,0		4,8	6,0	12,2	18,0	20,2	22,8	
- quantité de glucides insolubles														
• en mg pr 100 organes	5,4	15,3	20,3	34,8	34,1	39,3		534,3	392	246,7	170,5	111,8	72,3	
• en mg pr 100 mg de substances sèches	3,8	6,4	5,1	6,4	5,2	5,3		36,2	30,6	24,0	20,3	15,6	12,7	

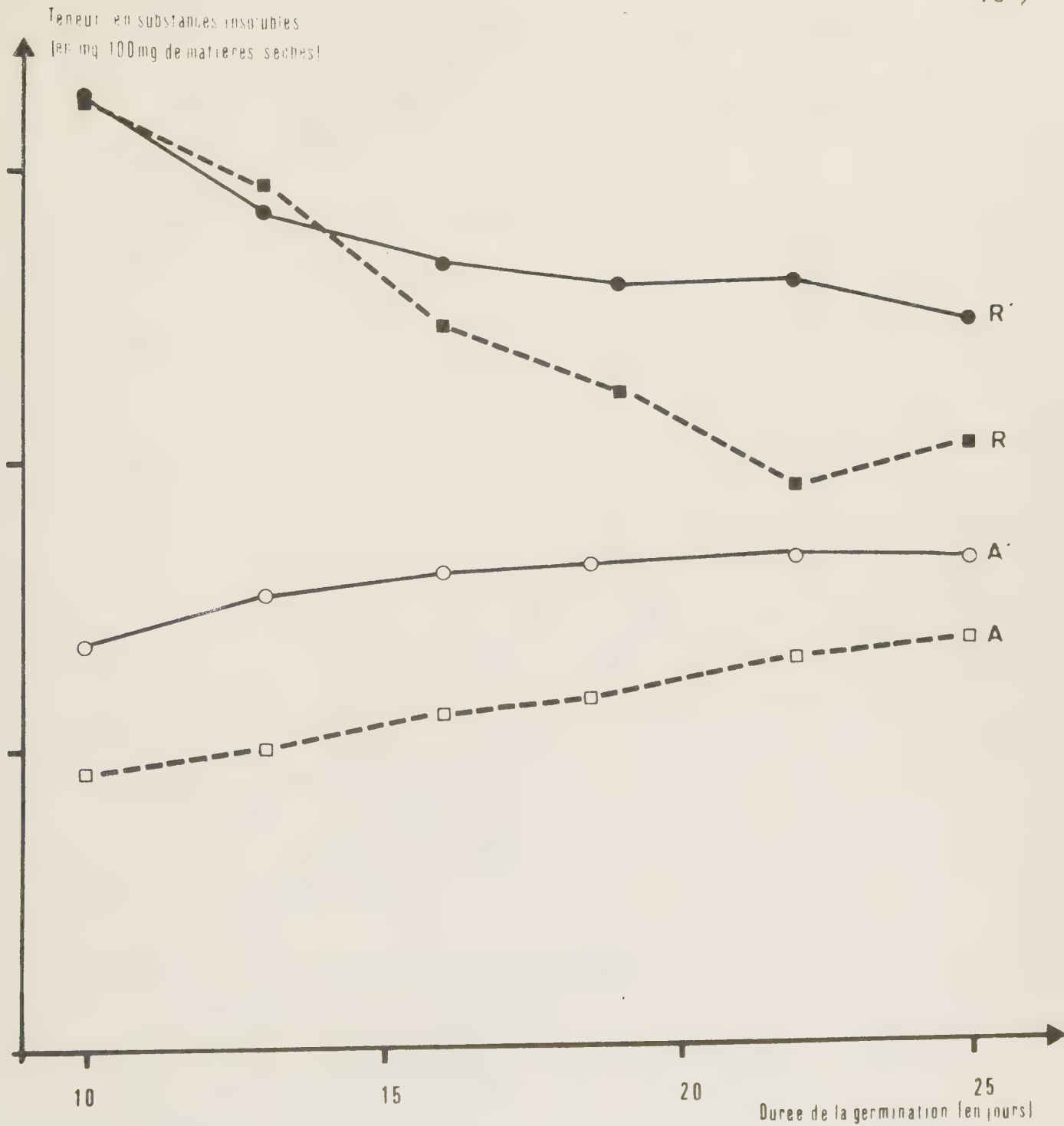
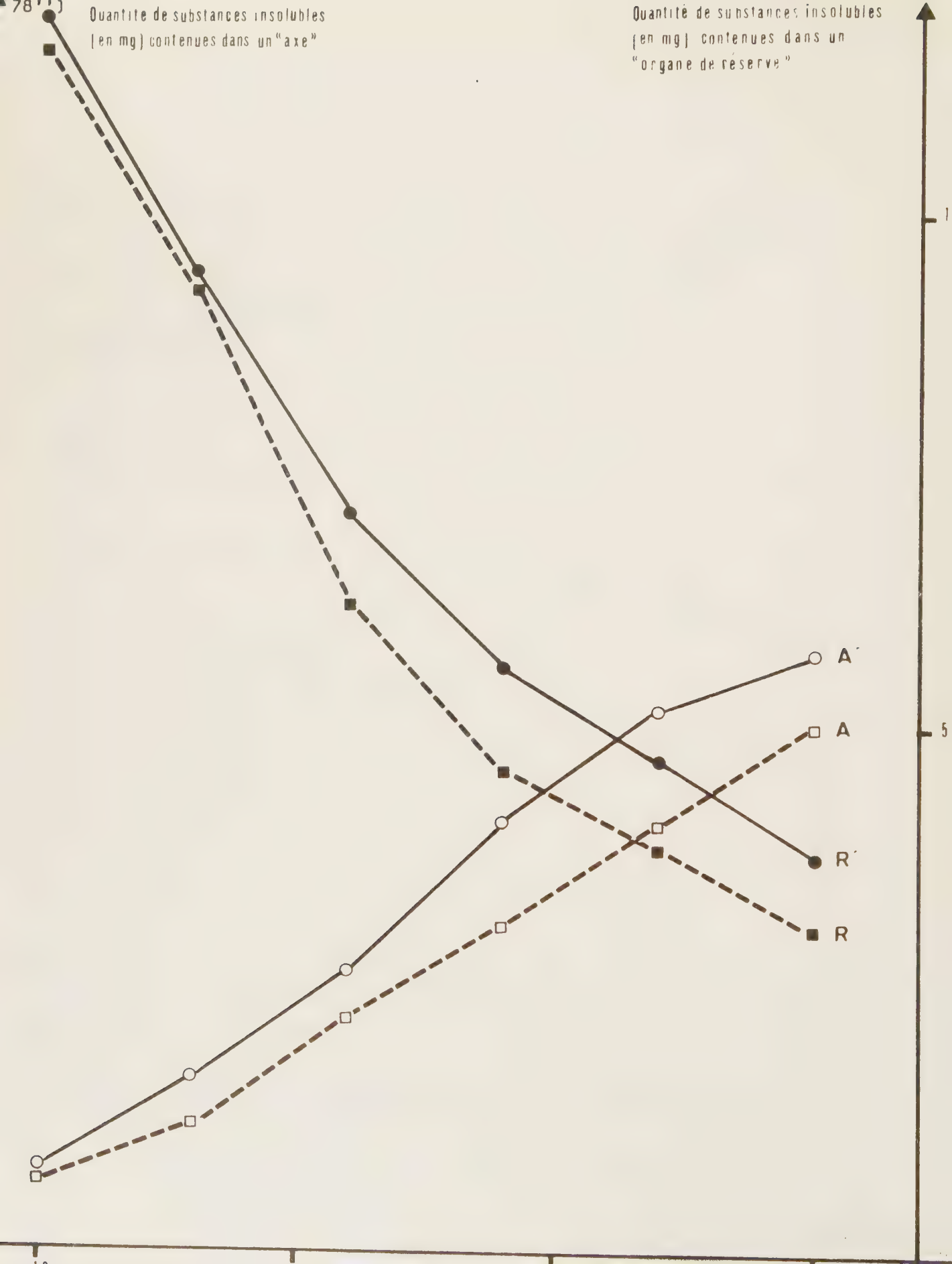


Fig. 30 : Evolution des substances insolubles au cours de la germination des graines d'Asperge.

Les résultats (en mg) sont rapportés à 100 mg de matière sèche.

a - germination à l'obscurité : R = organes de réserve
A = parties "axiales"

b - germination à la lumière : R' = organes de réserve
A' = parties "axiales"



- La chromatographie en phase gazeuse des dérivés TMS des glucides solubles, en présence de quantités déterminées d'un " témoin interne " 1 α méthyl-mannose (cf. Ière partie: les conditions expérimentales en programmation de température) permet de calculer à chaque stade les quantités de glucose, de fructose et de saccharose (57.59.29).

α Evolution de la composition des fractions hydroalcooliques.

La chromatographie sur papier montre qu'à tous les stades, les " parties axiales ", comme les organes de réserve conservent la même composition qualitative: glucose, fructose, saccharose et quatre oligofructosides (après élution, ces glucides ne libèrent lors de l'hydrolyse acide que du glucose et du fructose). Cette composition est semblable à celle observée dans les graines non germées à ceci près que le glucose et le fructose présents à l'état de traces dans les graines non germées, sont abondants dans les diverses parties des plantules. Cette technique ne permet pas de mettre en évidence la présence du mannose car le R_f de cet hexose est identique à celui du fructose. C'est pourquoi nous avons eu recours à l'artifice suivant: une partie de la solution hydroalcoolique est hydrolysée, neutralisée et chromatographiée sur papier. Les glucides migrant à la même distance que le fructose sont alors élués. L'éluat est concentré, silylé et analysé par chromatographie en phase gazeuse. Avec cette technique, les temps de rétention de 1 α mannose et de 1 α fructose sont très voisins, mais la présence ou l'absence d'un pic de β mannose permet de conclure sans équivoque à la présence ou à l'absence de mannose dans la solution analysée. La présence de très faibles quantités de mannose peut ainsi être mise en évidence dans les organes de réserve (mais non dans les " parties axiales ")-

β Evolution des quantités de glucides solubles au cours de la germination (tableau 21)

La comparaison des résultats obtenus par les deux techniques utilisées permet de constater les faits suivants:

Fig: 29: Evolution des substances insolubles au cours de la germination des graines d' Asperge.

- Germination à l'obscurité: A = parties " axiales "
R = organes de réserve
- Germination à la lumière: A' = parties " axiales "
R' = organes de réserve

Tableau 21: Evolution des glucides solubles au cours de la germination des graines d'arachide.
 Comparaison des résultats obtenus par dosage, selon la technique de Nelson, et par dosage par chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats des dosages selon NELSON sont rapportés : A : à 100 organes
 B : à 100 mg de substances sèches

Les résultats (en mg) obtenus par chromatographie en phase gazeuse sont rapportés à 100 organes.

Organes étudiés	Parties axiales							Organes de réserve						
Nombre de j de germination	10	13	16	19	22	25		10	13	16	19	22	25	
A: Germination à la lumière														
- Dosages selon NELSON														
• Oses libres A	14,2	29,5	60,3	75,9	81,6	79,1		7,6	11	18	26	24	19,5	
B	12,9	13,7	17,7	14,9	12,9	11,1		0,51	0,85	1,67	2,95	3,25	3,15	
• Oses " liés A	15,7	25,2	41,1	69,7	105,6	90		63,8	72,2	109,4	127,4	108,6	110,5	
B	14,3	11,7	12,1	13,7	16,7	12,7		4,2	5,5	10,2	14,4	14,7	17,8	
• Oses libres/osés liés	0,90	1,01	1,46	1,09	0,77	0,77		0,12	0,15	0,16	0,20	0,22	0,18	
Chromatographie en phase gazeuse														
• Fructose	4,90	13,7	29,1	33,7	35,9	30,6		2,3	2,74	5,04	7,28	8,84	8,42	
• Glucose	5,72	14,2	28,6	33,3	39,0	29,6		2,95	6,29	11,7	17,52	13,52	13,0	
• Saccharose	8,17	22,4	23,9	33,8	57,2	55,7		57,2	62,95	101,4	124,8	105,05	110	
• Fructose/Glucose	0,86	0,96	1,02	1,01	0,92	1,02		0,78	0,44	0,43	0,42	0,65	0,65	
• Fructose+Glucose/ Saccharose	1,30	1,24	2,41	1,98	1,31	1,08		0,09	0,14	0,16	0,20	0,24	0,24	

B: Germination à l'obscurité

• Dosages selon NELSON

.Oses libres A	22,3	47,9	107,6	102,4	92,6	93,6	7,0	9,9	21	24	22	18
B	15,7	19,9	27,0	15,6	14,1	12,7	0,47	0,77	2,04	2,86	3,08	3,16
.Oses "liés" A	14	27	51	71,8	137,7	135,2	63	67	104,8	126,8	122,5	112
B	9,8	11,2	12,8	13,3	21,0	18,3	4,3	5,2	10,2	15,1	17,1	19,6
.Oses libres/oses liés	1,59	1,77	2,11	1,43	0,67	0,69	0,11	0,15	0,20	0,19	0,18	0,16

Chromatographie en phase gazeuse

• Fructose	11,5	22,4	50,7	46,8	38,5	40,0	2,50	3,12	7,28	8,32	7,28	6,34
• Glucose	10,9	21,8	47,7	43,4	34,9	35,4	3,70	4,70	10,40	13,0	12,25	11,18
• Saccharose	8,7	25,0	33,3	46,8	42,1	43,7	61,0	62,4	107,10	127,9	121,7	104
.Fructose/Glucose	1,05	1,03	1,06	1,08	1,10	1,13	0,68	0,66	0,70	0,64	0,59	0,57
• Fructose+Glucose/ Saccharose	2,57	1,77	2,45	2,10	1,74	1,72	0,10	0,12	0,16	0,17	0,16	0,17

- Si on additionne les quantités de glucose et de fructose (valeurs acquises en chromatographie en phase gazeuse) la somme obtenue est toujours légèrement inférieure à la quantité de sucres réducteurs déterminée par dosage colorimétrique; ceci peut être dû au fait que le dosage de NELSON-SOMOGYI permet d'estimer toutes les substances réductrices dans une solution, qu'elles soient ou non glucidiques.
- Dans les organes de réserve, la présence de très faibles quantités de mannose libre est mise en évidence par chromatographie en phase gazeuse. Les hexoses (glucose et fructose) restent toujours peu abondants bien que leur masse globale augmente au cours de la germination. La quantité de glucose est toujours légèrement supérieure à celle du fructose. Les oligosides sont surtout représentés par le saccharose, les autres oligofructosides n'étant présents qu'à l'état de traces; en effet, la quantité de glucides " liés " n'est que légèrement supérieure à la quantité de saccharose. La quantité de saccharose double au cours de la germination. Le rapport fructose+glucose/saccharose garde une valeur extrêmement faible.
- Dans les parties axiales, les quantités des divers glucides augmentent fortement au cours de la germination. On y trouve toujours à peu près autant de glucose que de fructose. A la lumière, comme à l'obscurité, les sucres réducteurs libres sont toujours plus abondants que ne l'est le saccharose, [fructose+glucose/saccharose], et les oligofructosides sont présents en quantités relativement importantes; en effet, la quantité de glucides " liés " est nettement plus élevée que la quantité de saccharose. Enfin, il faut noter que les " parties axiales " des plantules se développant à la lumière sont généralement moins riches en glucides solubles que les parties axiales des plantules étiolées.

d) Evolution des polysaccharides au cours de la germination.

< polysaccharides entraînables par l'eau: Ces substances restent très peu abondantes par rapport à l'ensemble des constituants cellulaires, dans les organes de réserve comme dans les " parties axiales " (tableau 22). Les polymères glucidiques constituent des mélanges très hétérogènes tout au long de la germination (tableau 23). Les points suivants peuvent cependant être relevés:

- Dans les organes de réserve, la proportion relative de mannose, élevée en début de germination, diminue régulièrement. Parmi les glucides extraits avec les composés pectiques, l'arabinose et le galactose augmentent jusqu'à devenir les monosaccharides les plus abondants.
- Dans les parties axiales, les polysaccharides extraits par l'eau froide sont surtout riches en arabinose et en glucose alors que les glucides obtenus par extraction par l'eau chaude contiennent fort peu de glucose mais beaucoup d'arabinose et de galactose (ce dernier pouvant représenter jusqu'à 54% de l'ensemble des monosaccharides).

Tableau 23: Evolution de la composition des polysaccharides hydrosolubles au cours de la germination des graines d' Asperge.

Les résultats représentent les pourcentages des différents oses constitutifs de chacune des fractions glucidiques étudiées.

P r e m i e r e							O b s c u r i t é					
							10	13	16	19	22	25
Parties axiales												
polysaccharides extraits par H2O froide												
- arabinose	27	18	15	35	22	13	33	30	25	23	28	24
- xylose	14	23	32	8	21	32	10	21	23	17	21	14
- galactose	22	27	17	34	15	16	20	23	23	26	19	30
- glucose	24	22	24	18	24	29	32	23	20	25	21	22
- mannose	13	10	12	4	16	10	5	3	9	5	10	10
polysaccharides extraits par H2O chaude												
- arabinose		36	41	44	49	54	39	34	42	46	50	52
- xylose		10	10	16	10	11	7	7	14	10	17	12
- galactose		41	42	31	33	22	41	42	36	40	24	26
- glucose		8	4	5	5	8	10	9	5	2	5	6
- mannose		5	3	6	3	5	3	8	3	2	4	4
Organes de réserve												
Polysaccharides extraits par H2O chaude												
- arabinose	14	23	21	32	33	38	17	20	18	27	36	41
- xylose	4	5	5	8	13	8	4	5	5	7	14	11
- galactose	15	20	21	24	27	29	12	20	30	28	25	27
- glucose	27	24	27	21	15	14	27	24	28	22	15	12
- mannose	38	28	26	15	13	11	39	31	19	16	10	8

Les résultats sont exprimés en mg de substances réductrices libérées après hydrolyse acide de chaque fraction.

Les résultats(en mg) sont rapportés : A : à 100 organes
B : à 100 mg de substances sèches(m.s)

Organes étudiés	Parties axiales						Organes de réserve					
	10	13	16	19	22	25	10	13	16	19	22	25
Germination à la lumière												
- Polysaccharides extraits par H2O froide												
A.mg (100 organes)	0,07	1,6	3,15	4,56	5,80	4,12	6,5	6,4	5,9	7,6	3,1	2,4
B.mg (100 mg m.s)	0,06	0,71	0,9	0,9	0,9	0,6	0,44	0,49	0,55	0,86	0,42	0,39
- Polysaccharides extraits par H2O chaude												
A.mg (100 organes)	1,5	7,2	12,9	25,0	28,2	26,5	10,5	10,7	12,3	11,8	12,2	7,09
B.mg (100 mg.m.s)	1,36	3,35	3,74	4,85	4,44	3,71	0,77	0,82	1,15	1,34	1,65	1,28
- Hémicelluloses												
A.mg (100 organes)	3,0	11	18	22	29	36	536	410	297	88	154	113
B.mg (100 mg m.s)	2,7	5,1	5,3	4,3	4,6	5,1	35,8	31,3	27,6	21,3	20,8	18,2
Germination à l'obscurité												
- Polysaccharides extraits par H2O froide												
A.mg (100 organes)	0,08	1,5	5,0	5,1	6,7	5,75	6,8	6,0	5,3	5,6	4,0	1,4
B.mg (100mg m.s)	0,05	0,6	1,25	0,94	1,02	0,78	0,46	0,47	0,51	0,68	0,56	0,25
- Polysaccharides extraits par H2O chaude												
A.mg (100 organes)	1,7	7,1	7,9	22,6	16,25	17,0	9,8	10,0	11,5	13,5	13,75	8,20
B.mg (100 mg m.s)	1,17	2,96	1,98	4,14	2,48	2,30	0,67	0,78	1,12	1,64	1,92	1,44
- Hémicelluloses												
A.mg (100 organes)	4,5	11	14	21	22	28	526	384	239	161	103	68
B.m.g (100 mg m.s)	3,2	4,5	3,5	3,9	3,3	3,8	35,7	30,0	23,2	19,2	14,4	11,8

β - Hémicelluloses -(39) Ces polysaccharides constituent la substance principale des organes de réserve. leur quantité diminue régulièrement au cours de la germination (39). Les valeurs rapportées dans le tableau 22 sont inférieures aux valeurs réelles car les conditions de l'hydrolyse sur le résidu des extractions précédentes n'épuisent pas complètement le matériel végétal. Leur composition, simple (glucose et mannose en quantités équivalentes, traces de galactose) varie fort peu sauf en fin de germination où on observe une proportion un peu plus grande de glucose. Dans les parties axiales, la quantité d'hémicelluloses augmente au cours de la germination et leur importance relative s'élève avec l'âge des jeunes plantes (tableau 24). De composition très hétérogène au début, les hémicelluloses tendent à se simplifier, le xylose devenant le constituant principal. Cette accumulation de xylose est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité. La lumière semble d'ailleurs favoriser la synthèse de ces substances qui sont essentiellement des constituants membranaires des tissus de soutien (fig. 28).

e) Conclusion.

Au cours de la germination des graines d'Asperge, les organes de réserve se " vidant " progressivement. Les substances qui disparaissent ainsi sont essentiellement des glucomannanes. La quantité de glucides solubles (fructose, glucose et saccharose) par contre, augmente. Le rapport fructose+glucose/saccharose restant toujours < 1 . Les parties axiales qui se développent synthétisent en particulier des glucides solubles (fructose, glucose, saccharose et quelques oligo-fructosides) et " insolubles ". La germination à la lumière favorise la formation des hémicelluloses et plus particulièrement des xylanes. Ce phénomène pourrait être en rapport avec la formation de vaisseaux et de tissus de soutien. Après avoir ainsi constaté la disparition progressive des hémicelluloses des organes de réserve, nous allons aborder l'étude histologique et cytologique de ces organes afin de déterminer à quel niveau s'effectue cette dégradation et suivant quel schéma.

2°) Etude histologique et cytologique des organes de réserve au cours de la germination.

2. Etude de coupes effectuées au travers d'une graine après douze jours de germination.

⌘ Examen au microscope optique : Trois régions bien distinctes peuvent être observées (planche X)

• l'albumen, limité extérieurement par le tégument, est constitué par un ensemble de cellules à parois très épaisses présentant d'importantes ponctuations; riches en granulations lipidiques, ces cellules semblent dépourvues d'amidon.

le cotylédon est formé de cellules à parois très minces; plusieurs faisceaux libéroligneux y sont visibles.

la limite de ces deux formations se trouve une région constituée par les zones les plus internes de l'albumen; les cellules semblent se vider et, tout contre le cotylédon, on observe une sorte de treillis formé de débris de parois squelettiques (essentiellement des fragments de parois primaires). Nous appellerons cette région "zone intermédiaire" ou encore "zone de digestion". Cette structure en trois zones est voisine des images observées par KEUSCH au cours de la germination des graines de Dattes (56).

Tableau 24: Evolution de la composition des " hémicelluloses " au cours de la germination des graines d' Asperge.

Les résultats expriment les pourcentages des différents oses constitutifs des " hémicelluloses "

Conditions de la germination	O b s c u r i t é					L u m i è r e				
Durée de la germination (en j)	7	14	20	22	26	13	16	19	23	27
<u>Parties axiales</u>										
-arabinose		14	16	9	14	25	21	13	15	15
-xylose		23	25	33	36	21	31	41	44	51
-galactose		33	29	10	26	17	11	8	13	9
-glucose		22	22	40	16	25	26	27	18	18
-mannose		8	8	8	8	12	11	11	9	7
<u>Organes de réserve</u>										
-glucose	51	54	49	50	56	54	55	54	55	64
-mannose	49	46	51	50	44	46	45	46	45	36
-mannose/glucose	0,96	0,85	1,4	1,0	0,79	0,85	0,82	0,85	0,82	0,5

3. Examen au microscope électronique: Les cellules de l'albumen, non encore attaquées, sont semblables aux cellules observées dans les graines non germées: vacuoles très petites et nombreuses, cytoplasme dense, pas de Golgi, parois compactes (planche XI N° 1). Le début de la " digestion " se manifeste par une perte de la structure cellulaire (planche X N° 2); le cytoplasme devient vésiculeux, les divers organites disparaissent. Les parois squelettiques gonflent, sauf au niveau des ponctuations, prenant ainsi un aspect fusiforme (planche XIII). Le contenu de ces parois ne constitue plus un ensemble compact mais devient granuleux (planche XII). Peu à peu apparaissent des zones plus claires, disposées plus ou moins parallèlement (planche XII). Ces plages gélifiées s'étendent jusqu'à envahir tout l'espace préalablement occupé par la paroi (planche XIV). Contre le cotylédon se forme ainsi un tapis de débris cellulaires constitué essentiellement par des fragments de parois ayant perdu toute structure.

Il convient maintenant de déterminer à quel moment, au cours de la germination, apparaît cette zone de transition et de suivre l'évolution des différentes parties précédemment décrites.

Evolution des différentes parties au cours de la germination.

Les coupes sont pratiquées au travers des graines germées à divers stades de germination. A chaque stade, l'étendue des différentes zones est déterminée comme l'indique la figure 31. Nous avons ainsi constaté que:

- la " zone intermédiaire " apparaît vers le 7ème jour;
- au cours de la germination cette zone, qui n'atteint jamais de dimensions importantes, migre petit à petit vers les zones les plus externes de l'albumen. En fin de germination, elle n'est plus séparée du tégument que par deux ou trois couches de cellules.
- le cotylédon suit cette progression et finit par occuper presque tout l'espace qui était, au départ, celui de l'albumen. Sous le tégument, en fin de germination, le cotylédon a ainsi pris le relais de l'albumen (tableau 25)
- au cours de cette digestion de l'albumen, les cellules non encore atteintes (les plus externes) ne subissent apparemment pas de modifications: les surfaces cellulaires et les épaisseurs des parois restent assez stables (tableau 26).

Il est donc probable que la dégradation des cellules de l'albumen se produit au niveau de la zone intermédiaire; les métabolites ainsi formés permettent alors la croissance du cotylédon, ce dernier organe faisant, en quelque sorte, office de relais vers les "parties axiales " en croissance. S'il en est ainsi, l'albumen ne doit

Tableau 25: Evolution des dimensions des différentes régions au cours de la germination des graines d'Asperge (voir schéma de la figure 31 pour la signification des grandeurs mesurées)

Sur chacun des axes L et L', les dimensions ont été déterminées en pourcentage de la longueur et de la largeur totale de la coupe.

Durée de la germination(en jours)	Albumen		Cotylédon				
	1	1'	1	1'	L	z	L'
3	89	89	11	11		0	
5	82	81	18	19		0	
7	53	64	38	31	9		5
10	45	49	40	38	15		13
12	35	38	47	47	18		6
14	31	30	56	60	13		10
	20	22	66	64	14		14
19	20	21	72	71	7		7
20	18	20	74	73	8		7

Tableau 26: Evolution des dimensions des cellules de l'albumen au cours de la germination (chaque valeur = moyenne de 10 mesures) des graines d'Asperge (voir schéma figure 30)

Durée de la germination (en jours)	3	5	7	10	12	14	19
longueur (en μ)	3,64	3,76	3,40	4,0	3,60	3,50	3,60
largeur (en μ)	1,80	2,20	2,10	2,14	2,20	2,20	2,20
épaisseur de la membrane (en μ)	2,10	1,60	1,52	1,32	1,20	1,40	1,36

présenter que de faibles variations biochimiques, ces variations étant limitées aux cellules de la zone "intermédiaire". Le cotylédon, au contraire, peut être le siège d'importantes modifications. L'étude de l'évolution de la composition glucidique de l'albumen et du cotylédon au cours de la germination (à l'obscurité) va apporter des précisions sur ce point.

3°) Etude comparée de l'albumen et du cotylédon au cours de la germination

Comme le laissaient prévoir les observations microscopiques, le poids de l'albumen diminue régulièrement au cours de la germination, alors que celui du cotylédon augmente (fig.32) l'augmentation de poids du cotylédon demeurant toujours inférieure à la perte de poids de l'albumen.

a) Evolution des glucides solubles (tableau 27)

- Dans les cotylédons, la quantité de glucides solubles (réducteurs et non réducteurs) augmente très fortement au cours de la germination.
- De plus, le rapport fructose/glucose tend à augmenter; il semble donc que, parmi les nouveaux glucides apparus dans le cotylédon, le fructose soit formé préférentiellement au glucose.
- Dans les albumens, l'évolution suivante peut être relevée:
 - légère augmentation de la quantité de sucres réducteurs libres;
 - faible diminution de la quantité de saccharose.

b) Evolution des polysaccharides.

α. Polysaccharides entraînés par l'eau:

La quantité de ces polysaccharides diminue dans les albumens et augmente dans les cotylédons au cours de la germination. Dans tous les cas, ces composés sont très peu abondants (tableau 27). Dans les albumens, les substances glucidiques extraites par l'eau froide sont hétérogènes, constituées d'arabinose, galactose, glucose et mannose avec un peu de xylose (tableau 28).

Les glucides extraits par l'eau bouillante contiennent surtout du glucose et du mannose, ces monosaccharides devenant relativement moins importants au cours de la germination. Dans les cotylédons, les glucides entraînés par l'eau bouillante sont surtout constitués par des polymères du galactose et de l'arabinose (tableau 28).

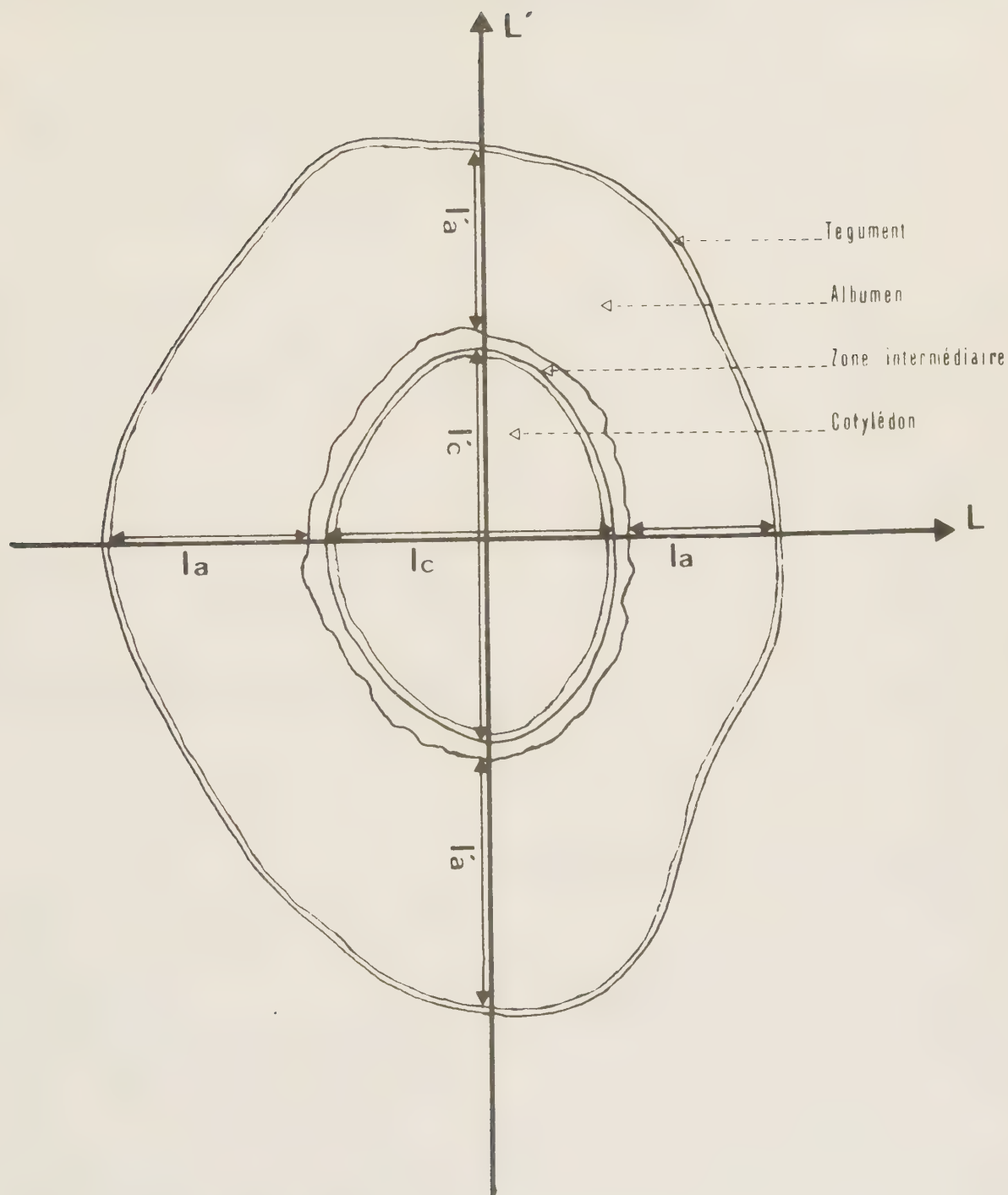


Fig. 31 : Schéma d'une coupe transversale d'une graine d'Asperge après 12 jours d'germination.

Tableau 27: Evolution des diverses fractions glucidiques de l'albumen et du Cotylédon au cours de la germination des graines d'Asperge.

Les quantités d'oligosides et de polysaccharides sont exprimées en mg de substances réductrices libérées après hydrolyse acide.

Les quantités de glucose, fructose et saccharose ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse.

Organe étudié	A l b u m e n s			C o t y l é d o n s		
Durée de la germination (en jours)	14	18	22	14	18	22
<u>Glucines solubles</u>						
a) sucres réducteurs libres						
- mg/organe x 100	4,24	7,16	6,16	6,52	15,5	16,93
- mg/100 mg matières sèches	0,33	0,82	0,81	7,0	11,5	11,1
- rapport fructose/glucose	0,70	0,74	0,93	0,34	0,70	0,74
b) oligosides						
mg/ organe x 100	44,96	44,07	36,17	27,48	51,3	63,67
mg/ 100 mg matières sèches	3,46	5,06	4,76	29,8	38,0	41,9
c) rapport (fructose+glucose) / saccharose	0,12	0,11	0,05	0,24	0,25	0,32
<u>Polysaccharides extraits par H2O froide</u>						
mg/organe x 100	1,68	1,67	1,06	0,29	0,41	2,16
mg/100 mg matières sèches	0,13	0,19	0,14	0,31	0,30	1,42
<u>Polysaccharides extraits par H2O chaude</u>						
mg/organe x 100	8,1	4,3	1,43	0,62	1,50	1,60
mg/100 mg matières sèches	0,62	0,49	0,19	0,67	1,11	1,05
<u>Hémicelluloses</u>						
mg/ organe x 100	4,74	3,13	250	4,51	4,88	3,72
mg/100 mg matières sèches	36,5	36	33	4,9	3,6	2,5

Tableau 28: Evolution de la composition chimique des divers polysaccharides des organes de réserve au cours de la germination des graines d'Asperge.

Les résultats expriment les pourcentages des différents oses constitutifs de chacune des fractions glucidiques étudiées.

Nature des organes étudiés	A l b u m e n s			C o t y l é d o n s		
Durée de la germination (en jours)	14	18	22	14	18	22
<u>Polysaccharides extraits par H2O froide</u>						
arabinose	20	24	29	25	28	35
xylose	7	13	10	8	9	10
glucose	28	21	16	24	16	15
mannose	28	24	22	10	5	5
galactose	17	18	24	33	42	45
<u>Polysaccharides extraits par H2O chaude.</u>						
arabinose	24	26	15	36	38	40
xylose	5	6	7	5	11	10
glucose	21	20	28	16	9	11
mannose	37	31	24	7	10	11
galactose	13	16	25	36	32	28
<u>"Hémicelluloses"</u>						
arabinose				20	22	22
xylose				16	13	14
glucose	49	51	50	15	16	24
mannose	51	49	50	22	20	16
galactose				27	28	27
M/G	1,05	0,94	1,00			

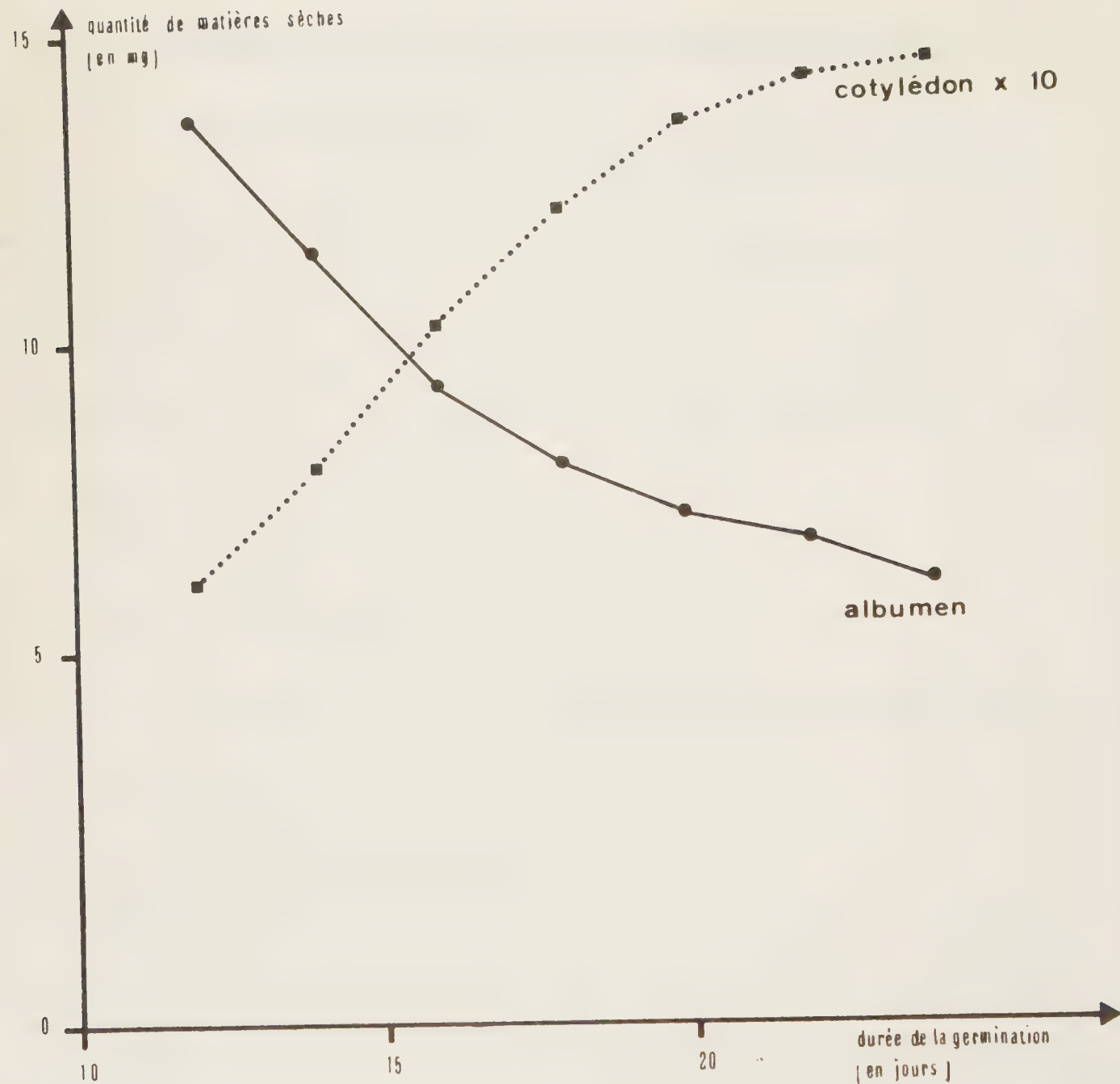


Fig. 32 : Evolution du poids de matière sèche de l'albumen et du cotylédon au cours de la germination des graines d'Asperge à l'obscurité.

-β Hémicelluloses

Dans les albumens, la quantité d'hémicelluloses diminue, mais ces composés gardent toujours sensiblement la même composition: mannose et glucose en quantités équivalentes, traces de galactose, (tableau 28). Dans le cotylédon, par contre, les "hémicelluloses" forment un ensemble beaucoup plus hétérogène et relativement pauvre en mannose (tableau 28). De plus, la quantité de ces substances demeure, dans ces organes, toujours faible. Les hémicelluloses du cotylédon sont donc toutes différentes de celles de l'albumen.

Au cours de la germination, le cotylédon se développe et la surface occupée par les parois s'accroît d'où une légère augmentation de la quantité d'hémicelluloses. D'autre part, la quantité de sucres réducteurs libérés après hydrolyse acide de 100 mg de substance insoluble diminue, il y a donc vraisemblablement augmentation de la teneur en cellulose (tableau 27).

Les variations constatées dans les organes de réserve au cours de la germination étaient dues au développement du cotylédon. Cet organe s'accroît alors que l'albumen disparaît; les variations observées globalement lors de l'étude de l'ensemble des organes de réserve, représentaient donc la résultante de ces deux phénomènes.

CONCLUSION

Au cours de la germination des graines d'Asperge, les couches de cellules les plus internes de l'albumen (au contact du cotylédon) se transforment et constituent une sorte de "zone de digestion" dans laquelle les parois cellulaires sont peu à peu désagrégées. La composition chimique des régions non atteintes de l'albumen demeure à peu près stable: les glucomannanes localisées au niveau des parois squelettiques restent le principal constituant cellulaire. Progressivement, la zone de digestion migre vers l'extérieur de la graine; en même temps, le cotylédon s'accroît en volume et en poids occupant ainsi les régions préalablement transformées par la zone de digestion dont l'étendue varie peu.

Ce schéma général se distingue donc des phénomènes de "digestion" qui se produisent dans les caryopses de graminées en germination: en effet, le scutellum ne se développe pas, les quantités de ses principaux constituants biochimiques restent à peu près constantes.

Enfin, il peut être intéressant de remarquer que les hémicelluloses synthétisées dans le cotylédon et dans les parties axiales, ont une constitution totalement différente de celle des polysaccharides de l'albumen (glucomannanes); leur rôle est probablement tout à fait différent: les premiers sont des substances de réserve, les seconds sont des substances qui participent à l'édification des nouveaux tissus.

Dans la dernière partie de ce travail, nous allons tenter de mettre en évidence les mécanismes biochimiques qui interviennent au cours de cette " digestion " des glucomannanes.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DES SYSTEMES ENZYMATIQUES SUSCEPTIBLES D'INTERVENIR

DANS LA DEGRADATION ET L'UTILISATION DES GLUCOMANNANES

AU COURS DE LA GERMINATION

Dans les graines d'Asperge, les glucomannanes constituent les membranes secondaires très épaisses des cellules de l'albumen et représentent la principale substance de réserve. Il convient d'essayer de préciser maintenant la nature des systèmes enzymatiques qui interviennent dans l'utilisation de ces composés au cours de la germination. Pour cela, nous allons d'abord étudier " in vitro " les mécanismes de dégradation des polysaccharides par un extrait enzymatique obtenu à partir de graines d'Asperge. Les activités enzymatiques, ainsi mises en évidence, seront alors recherchées dans les diverses parties des semences germées et l'évolution de ces activités sera suivie au cours de la germination. Enfin, l'étude de l'incorporation de mannose radioactif par des graines germées permettra de tracer un schéma des voies d'utilisation possibles des métabolites issus de la dégradation des glucomannanes.

A) Etude " in vitro " des mécanismes de dégradation des glucomannanes.

Dans le but de rechercher la nature des mécanismes dégradatifs des polysaccharides au cours de la germination, diverses expériences ont été menées " in vitro " avec des glucomannanes d'Asperge et, dans quelques cas, avec les polysaccharides extraits des graines de Jacinthe.

1°) Etude de l'hydrolyse " in vitro " des glucomannanes d'Asperge par un extrait enzymatique.

a) Obtention de l'extrait enzymatique: La " solution enzymatique " est préparée à partir de graines d'Asperge dans les conditions décrites dans la première partie (voir p. 33)

b) Mise en évidence de l'hydrolyse et détermination de la nature des glucides libérés.

50 mg de polysaccharides sont placés 20 h dans un bain-marie à 37°C dans 10 ml de tampon acétate pH 4,7, contenant 2 ml de " solution enzymatique ". Après ce laps de temps, la solution, comme nous l'avons vu précédemment (p. 38) contient 12 mg de sucres réducteurs. Si cette solution débarrassée par filtration des polysaccharides insolubles non dégradés, subit une hydrolyse acide ($\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$ -30mn à 100°), elle contient alors 25 mg de sucres réducteurs. L'extrait enzymatique a donc provoqué la libération, non seulement

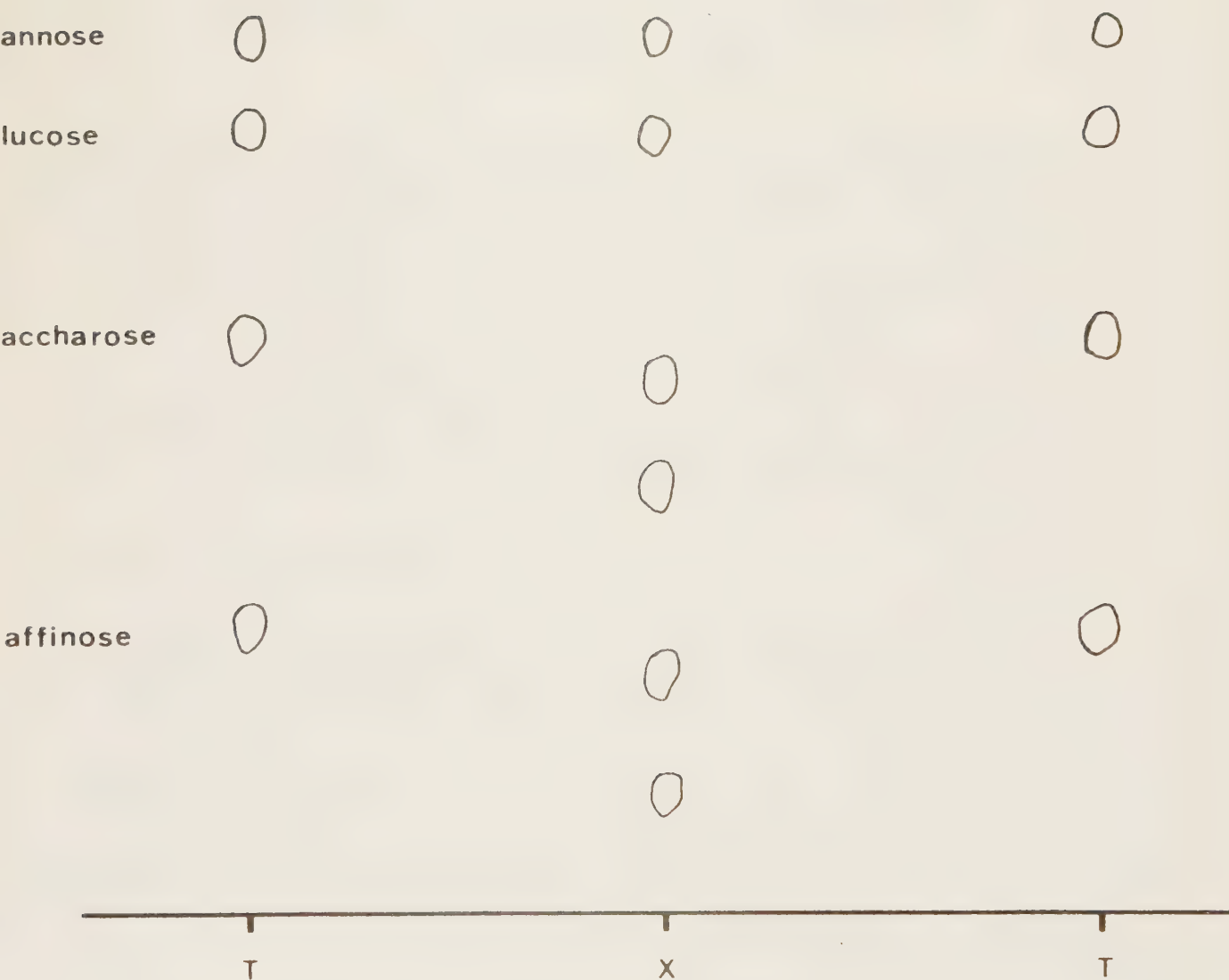


Fig. 33 : Chromatographie de la solution obtenue après 20 h. d'incubation des polysaccharides d'Asperge avec 2 ml de "solution enzymatique".

T : mélange de glucides témoins.

X : solution obtenue après 20 h. d'incubation.

d'hexoses, mais encore d'oligosides. La chromatographie sur papier de la solution, après action enzymatique, et avant hydrolyse acide complémentaire, confirme ces résultats (fig.33) en révélant la présence, à côté des hexoses (mannose, glucose, un peu de galactose) de toute une série d'oligosides. L'élution de chacun de ces oligosides suivie d'hydrolyse acide des éluats et de la chromatographie en phase gazeuse des dérivés TMS des monosaccharides libérés après l'hydrolyse acide, permet de constater que les oligosides étaient des molécules mixtes, c'est-à-dire contenant à la fois du glucose et du mannose.

Deux types d'activités peuvent donc être distingués dans l'extrait enzymatique: d'une part une activité osidasique (estimée par la quantité de sucres réducteurs libres "détachés" des glucomannanes sous l'action de 2ml d'extrait) d'autre part, une activité polysaccharasique (estimée par la quantité d'oligosides solubles apparus dans les mêmes conditions). Il nous faut maintenant établir s'il s'agit de deux activités simples ou si, au contraire, chacune d'entre elles n'est que la résultante d'un certain nombre d'activités enzymatiques.

c) Evolution des deux types d'activité (osidasique et polysaccharasique) en fonction de divers facteurs.

- ✓ Influence de la durée de l'incubation: Le tableau 29 montre que la quantité de sucres réducteurs libérés augmente régulièrement en fonction de la durée de l'incubation. Après huit jours d'incubation, il n'y a toujours pas de palier bien net. La quantité d'oligosides apparus, par contre, diminue légèrement après les vingt premières heures d'incubation, puis se stabilise. Il se pourrait donc qu'un certain équilibre existe entre les deux activités et que, au-delà d'un certain seuil, les oligosides soient hydrolysés dès leur apparition.

Tableau 29: Influence de la durée de l'incubation sur les quantités d'oses et d'oligosides libérés à partir de 50 mg de polysaccharides de graines d'Asperge.

Durée de l'incubation (en jours)	1	2	3	4	5	6
Quantité d'oses libérés (en mg)	12,1	15,3	19,5	22,8	24,8	25,2
Quantité d'oligosides libérés (exprimés en mg d'oses)	12,8	10,4	8,4	9,0	8,9	9,2

- β - Influence du pH (tableau 30) : L'activité osidasique présente un optimum autour de pH 4,7. Ceci est normal puisque, d'après les données bibliographiques (1) et nos propres expériences, les diverses osidases végétales ont des activités optimales pour des pH variant de 4,0 à 6,0. Les résultats concernant l'activité polysaccharasique ne sont pas très nets. Tout se passe comme si cette activité était en réalité la résultante de diverses activités enzymatiques.

Tableau 30: Influence du pH sur les quantités d'oses et d'oligosides libérés à partir de 30 mg de glucomannanes de graines d'Asperge.

	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	5,0	5,3	5,6	5,9
Quantité d'oses libérés (en mg)	1,45	1,95	2,43	2,30	2,70	2,60	2,55	2,46	1,82
Quantité d'oligosides libérés (exprimés en mg d'oses)	5,8	5,3	4,5	4,9	4,5	4,7	4,4	5,1	4,3

ζ Influence de la concentration du substrat et de la concentration en enzymes. (tableaux 31 et 32) Les quantités d'oses et d'oligosides libérés augmentent lorsque la concentration du substrat ou la concentration de la solution enzymatique s'élèvent. Cependant, il n'est pas possible de tracer la courbe $1/V = f(1/S)$ car les points ne s'ordonnent pas suivant une droite. D'autre part, il est toujours aléatoire d'essayer de déterminer des K_M avec des substrats non solubles et, d'autre part, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les comportements des deux types d'activités enzymatiques:

- Activité polysaccharasique: Si plusieurs polysaccharases interviennent, chacune d'entre elles peut avoir une constante d'affinité différente pour les glucomannanes, ce qui explique alors l'impossibilité d'établir un K_M unique pour l'activité polysaccharasique.
- Activité osidasique: Si au temps 0, les osidases ne peuvent hydrolyser que les extrémités des chaînes de glucomannanes, au fur et à mesure qu'interviennent les polysaccharases, les produits de leur activité s'ajoutent au substrat disponible; il est donc incorrect de ne compter que la quantité de glucomannanes pour établir $1/S$. De plus, si plusieurs osidases interviennent, leurs constantes d'affinités ne sont probablement pas identiques.

Il semble donc que l'hydrolyse des glucomannanes soit la résultante d'un ensemble complexe de réactions enzymatiques différentes interférant les unes avec les autres.

Afin de vérifier ces hypothèses, deux séries d'expériences vont être menées:

- Pour mettre en évidence la multiplicité des activités osidasiques, l'influence de la durée de l'incubation sur la nature des hexoses va être étudiée.
- En ce qui concerne l'activité polysaccharasique, le "tamisage" sur gel " Sephadex " devrait permettre, si plusieurs réactions enzymatiques interviennent, de séparer les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des glucomannanes.

d) Influence de la durée de l'incubation sur la nature des hexoses

libérés. Les expériences ont été menées d'une part avec des glucomannanes d'Asperge, d'autre part avec les glucomannanes A et B extraites des semences de Jacinthe. Dans tous les cas, la composition de la solution d'incubation évolue sensiblement avec la durée de l'incubation (tableau 33): la proportion de mannose libéré (par rapport au glucose), assez faible après 20 h, tend à augmenter régulièrement. Des résultats analogues sont obtenus avec une solution de cellulase. Or, nous savons que cette préparation contient plusieurs enzymes. Tout se passe comme si deux enzymes (glucosidase et mannosidase) intervenaient en hydrolysant les polysaccharides avec des vitesses différentes.

Tableau 31 : Influence de la concentration du substrat sur les quantités d'oses et d'oligosides libérés à partir des glucomannanes.

Quantité de glucomannanes (en mg)	2	5	10	20	30	40	50
Quantités d'oses libérés (en mg)	1,54	1,86	2,01	2,18	2,60	3,0	3,28
Quantité d'oligosides libérés (en mg)	2,1	2,5	3,4	3,6	4,1	5,6	6,2

Tableau 32 : Influence de la concentration de la solution enzymatique sur les quantités d'oses et d'oligosides libérés à partir de 30 g de glucomannanes.

Volume de l'extrait enzymatique brut mis à incuber 20h à 37° (en ml)	0,5	1	1,5	2	3	3,5	4
Quantité d'oses libérés (en mg)	0,82	1,18	1,54	1,89	2,19	2,37	2,82
Quantité d'oligosides libérés (en mg)	1,24	1,97	2,17	2,49	3,17	3,33	3,41

Tableau 33: Influence de la durée de l'incubation sur la nature des hexoses libérés.

L'incubation se fait en tampon acétate pH 4,7 en présence de 50mg de glucomannanes des graines d'Asperge et de Jacinthe.

Durée de l'incubation (en jours)	1	2	4	6	8
A) <u>Expérience avec des glucomannanes d'Asperge.</u>					
Evolution du rapport mannose/glucose					
. Incubation avec une solution extraite de graines d'Asperge.	0,84	0,98	1,07	1,12	1,18
. Incubation avec une solution de cellulase.	0,40	0,42	0,76	0,81	0,84
B) <u>Expérience avec les polysaccharides de Jacinthe.</u>					
Evolution du rapport mannose/glucose					
. Incubation avec une solution de cellulase : fraction A	0,40	0,55	0,70	0,76	0,84
fraction B	0,74	0,87	0,92	1,21	1,54

e) Activités de l'extrait enzymatique après tamisage moléculaire sur gel Sephadex. Les diverses fractions protéiques, obtenues après tamisage moléculaire sur gel Sephadex G 100 (colonne de 100 cm de haut et 2,5 cm de diamètre - élution par du tampon acétate pH 4,7) sont laissées 20h au bain-marie à 37° en présence de 40 mg de polysaccharides; après arrêt des réactions enzymatiques et filtration, les glucides d'une partie aliquote de chaque fraction, sont dosés par le réactif à l'antrone (la totalité des glucides solubles est alors déterminée). Les trois pics A.B.C. ainsi obtenus (fig. 34) correspondent vraisemblablement à des glucides solubles, libérés sous l'action de trois enzymes ou groupes d'enzymes différents (-les protéines enzymatiques étant éluées en fonction de leur masse moléculaire).

Les fractions glucidiques appartenant à un même pic sont réunies, la composition des trois solutions: A.B.C. ainsi obtenues, est déterminée par chromatographie sur papier (fig.35). Le pic A est surtout constitué par des hexoses: galactose, glucose et mannose; les pics B et C, par contre, contiennent essentiellement des oligosides. Il est donc probable qu'au moins deux polysaccharases, différant par leur masse moléculaire, interviennent dans l'hydrolyse des glucomannanes. L'hydrolyse acide des trois fractions glucidiques, A.B.C., suivie de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse après silylation des hexoses libérés, permet de constater que les trois fractions contiennent du glucose et du mannose.

L'hydrolyse des polysaccharides " in vitro " peut donc s'effectuer à la suite de l'intervention de plusieurs polysaccharases et osidases. Dans une dernière étape, les diverses osidases susceptibles d'intervenir dans l'hydrolyse des glucomannanes vont être recherchées dans l'extrait protéique. Chaque osidase est mise en évidence par l'hydrolyse d'un substrat synthétique spécifique.

2°) Analyse des activités osidasiques de l'extrait protéique.

a) étude de l'extrait enzymatique " brut " Comme le montre le tableau 34, l'extrait protéique brut est capable d'hydrolyser l' α phényl-galactose, les α et β phényl-glucoses, l' α phényl-mannose et, plus faiblement, le β phényl-mannose.

Fig: 34: Tamisage moléculaire sur gel Sephadex G 100 de l'extrait enzymatique "brut" et activité hydrolasique des diverses fractions éluées.

- l'activité hydrolasique est estimée par la quantité de glucides solubles libérés à partir de 40 mg de glucomannanes, les glucides solubles sont dosés par le réactif à l'antrone.(●————●)
- la quantité de protéines de chaque fraction est estimée par l'absorption à 280 nm (■.....■)

D.O à 650 nm. 1023
 après action du réactif
 à l'anthrone

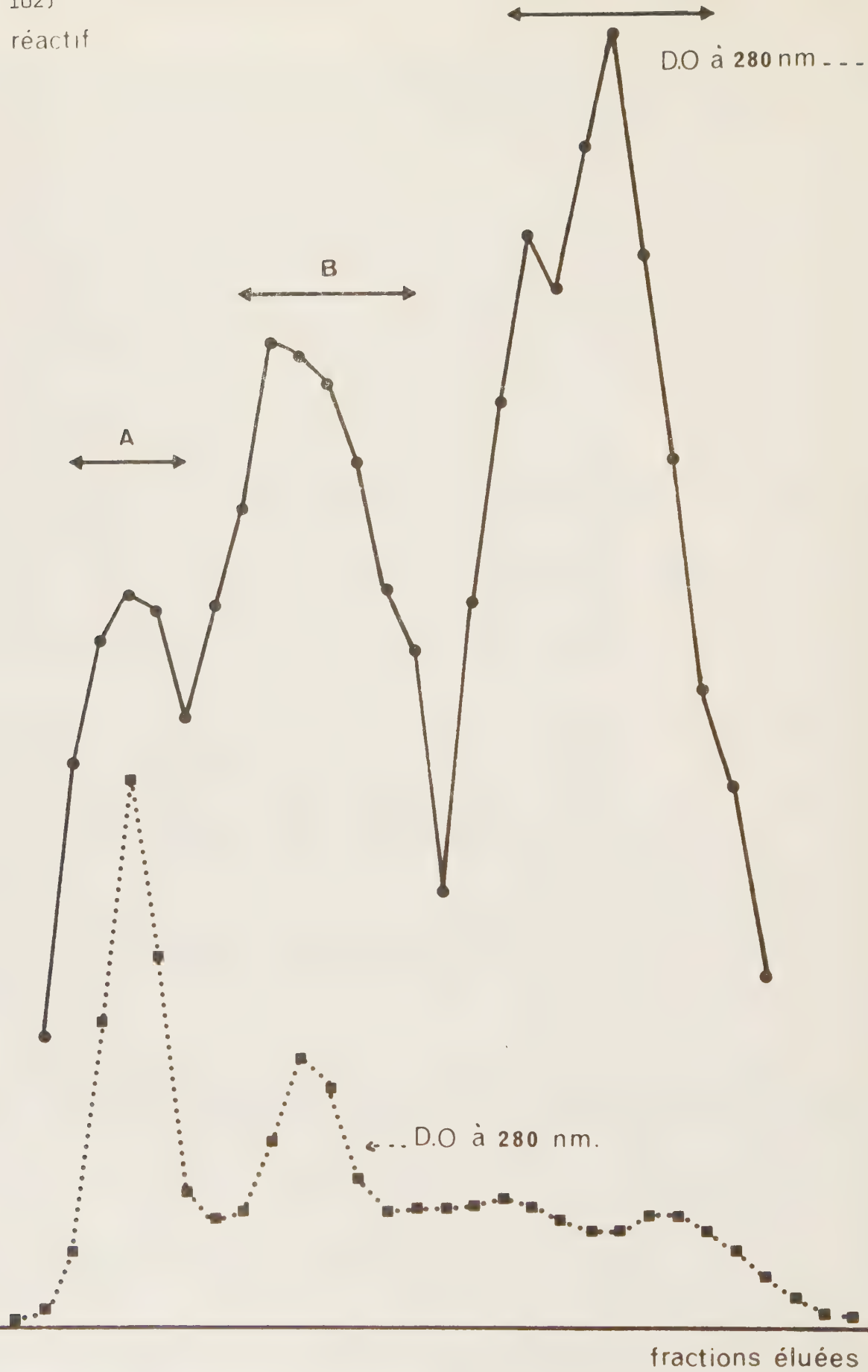


Fig. 34: Tamisage moléculaire sur gel Séphader G100 de l'extrait enzymatique et de

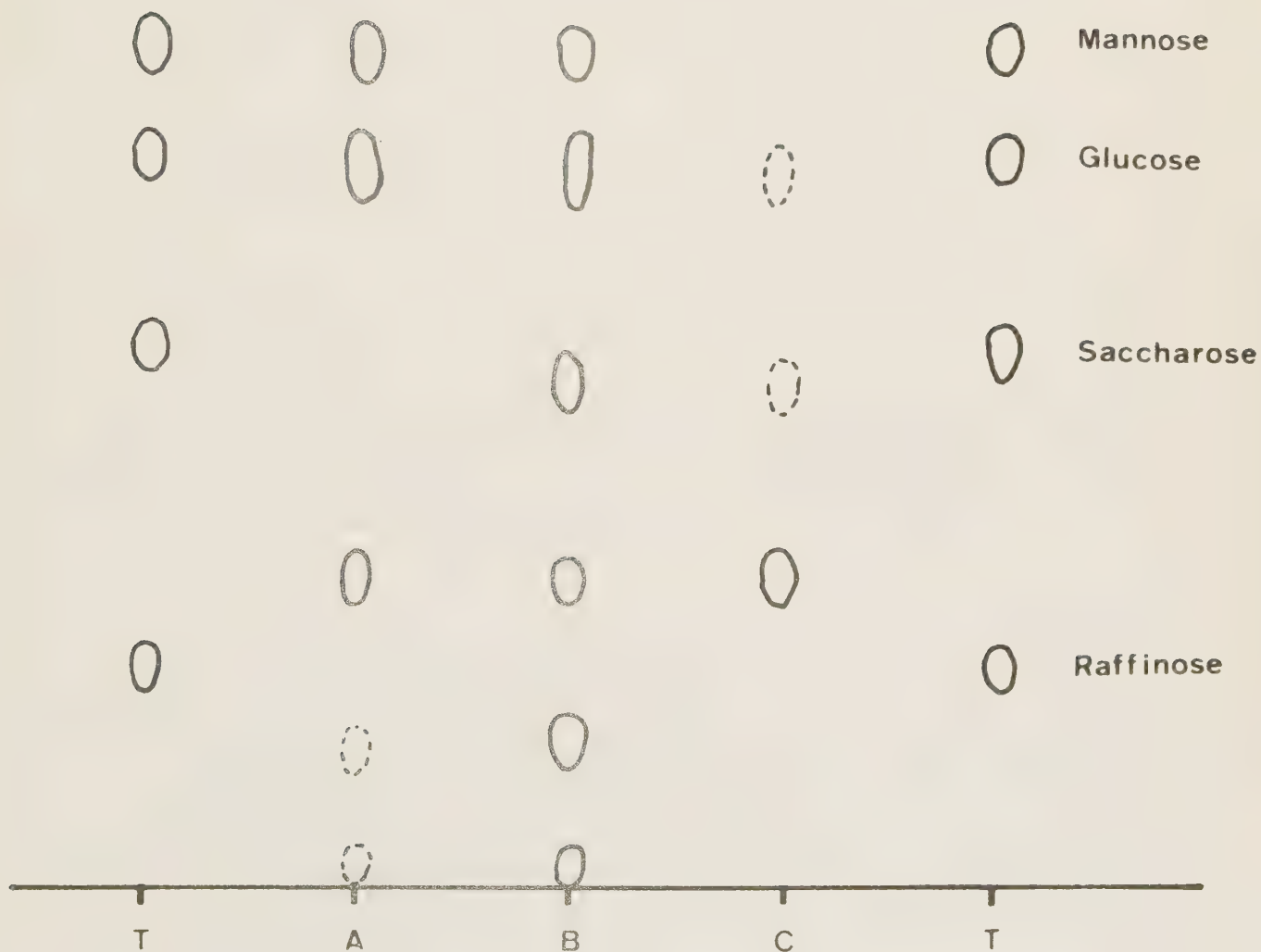


Fig. 35 : Chromatographie sur papier des 3 solutions glucidiques A, B et C obtenues par action sur les glucomannanes de diverses fractions protéiques (voir fig.

T : mélange de glucides témoins.

Tableau 34 : Activités osidasiques de l'extrait enzymatique " brut ".

Les activités sont exprimées en μ M de substrat hydrolysé par 1 ml d'extrait enzymatique (contenant 268 μ g d'azote) en 6h (pour 1 α phényl-galactoside et 1 α phényl-mannoside) ou en 20 h(pour les autres substrats)

Nature du substrat	Activité osidasique
α phénylglucoside	4,3
β phénylglucoside	5,3
α phénylmannoside	20,8
β phénylmannoside	0,4
α phénylgalactoside	41,6

b) activités de l'extrait enzymatique après tamisage moléculaire-sur gel Sephadex. Les principales osidases (comme nous l'avons montré dans la première partie de ce travail p.40), peuvent être séparées par filtration sur gel Sephadex G 100.

CONCLUSION:

L'hydrolyse " in vitro " des glucomannanes par un extrait enzymatique " brut " obtenu à partir de graines d'Asperge pourrait donc s'effectuer de la manière suivante: dans un premier temps interviendraient, d'une part, 1 α galactosidase, qui détacherait les molécules terminales d' α galactose, d'autre part plusieurs (au moins deux) polysaccharases, qui couperaient la chaîne de polysaccharides en des endroits déterminés, libérant ainsi une série d'oligosides. Il pourrait s'agir de β glucanases ou de β mannanases. Ces genres d'enzymes ont en effet été mis en évidence chez divers organismes végétaux (25.26.69.I03).

Dans un deuxième temps agiraient peut-être des osidases (β glucosidase et β mannosidase) qui pourraient attaquer les extrémités (maintenant dépourvues de molécules d' α galactose) et les oligosides libérés dans le milieu. Ce schéma serait conforme à celui proposé par KATZ et ORDIN pour expliquer l'hydrolyse des substances membranaires des coléoptiles d'Avena sativa (55). L'évolution de ces diverses activités enzymatiques au cours de la germination va maintenant être suivie.

B) Evolution, au cours de la germination, des activités enzymatiques susceptibles d'intervenir dans la dégradation des glucomannanes.

Les glucomannanes qui disparaissent progressivement dans les albumens au cours de la germination des graines d'Asperge sont-elles dégradées suivant un processus hydrolasique identique à celui proposé au chapitre précédent, pour expliquer l'hydrolyse " in vitro " de ces polysaccharides par un extrait enzymatique? Pour répondre à cette question, les études suivantes vont être entreprises:

- tout d'abord, celle de l'évolution des activités osidasiques et polysaccharasiques dans les différentes parties des semences, au cours de la germination.
- dans un deuxième temps, celle de l'évolution des diverses activités osidasiques susceptibles d'intervenir dans l'hydrolyse des glucomannanes au cours de la germination de diverses semences possédant des réserves de natures différentes.

1°) Evolution des activités osidasiques et polysaccharasiques au cours de la germination des graines d'Asperge.

Des albumens, des cotylédons et des " parties axiales " (radicule et épicotyle) de semences germées sont broyées dans du tampon acétate pH 4,7. Des fractions aliquotes sont laissées 20h au bain-marie à 37° en présence de glucomannanes. Les solutions sont alors filtrées et les quantités de sucres réducteurs libres sont déterminées avant et après hydrolyse acide. Les broyats d'albumens et de cotylédons sont capables de provoquer la libération d'oligosides et d'oses à partir de glucomannanes. Par contre les " parties axiales " sont sans action sur ces polysaccharides (tableau 35). Au cours de la germination, les activités hydrolasiques de l'albumen passent par un maximum (14ème jour de la germination) puis diminuent fortement. Dans le cotylédon, les deux types d'activités passent également par un maximum vers le 16ème jour mais, alors que l'activité osidasique reste assez importante, l'activité polysaccharasique devient nulle en fin de germination. Si les activités sont exprimées non plus en mg de produit formé par un albumen ou un cotylédon mais en mg de produit formé par 100 mg de matière sèche d'albumen ou de cotylédon, l'activité osidasique est alors nettement plus forte dans le cotylédon que dans l'albumen et cela tout au long de la germination. Quant à l'activité polysaccharasique, très élevée dans le cotylédon jusqu'au 18ème jour, elle disparaît de cet organe en fin de germination.

Le cotylédon, comme l'albumen, possède donc des enzymes capables de provoquer la formation d'oses et d'osides, à partir de glucomannanes. Si ces activités sont rapportées à 100 mg de matière sèche, le cotylédon apparaît comme un organe nettement plus actif que l'albumen.

Tableau 35 : Evolution des activités osidasiques et polysaccharasiques de l'albumen et du cotylédon au cours de la germination des graines d'Asperge.

Organes étudiés	A l b u m e n s							C o t y l é d o n s						
	12	14	16	18	20	22		12	14	16	18	20	22	
Activité osidasique exprimée en mg d'oses libérés par:														
10 organes	7,00	9,33	5,66	4,00	3,50	1,66		0,83	2,16	6,0	4,0	3,33	2,33	
100 mg matières sèches	4,83	7,40	5,49	4,49	4,21	2,24		13,83	25,71	31,57	30,5	22,97	15,43	
Activité polysaccharasique exprimée en mg d'oligosides libérés par:														
10 organes	1,33	2,33	4,0	3,66	2,66	2,33		1,0	1,83	1,33	0,66	0	0	
100 mg matières sèches	0,92	1,85	3,88	4,11	3,20	3,15		16,66	21,78	7,00	5,04	0	0	

Aucune activité hydrolasique (osidasique ou polysaccharasique) n'a pu être mise en évidence dans les " parties axiales " au cours de la germination.

2°) Etude de diverses activités osidasiques.

Les activités α et β glucosidasiques, α et β mannosidasiques ont été étudiées, bien que seules les β glucosidases et mannosidases puissent être impliquées dans l'hydrolyse des glucomannanes. Il nous a semblé cependant intéressant de considérer parallèlement les deux glucosidases et mannosidases afin de déterminer si les hydrolases pouvant intervenir dans l'utilisation des polysaccharides au cours de la germination, et d'autres hydrolases ne pouvant participer à cette dégradation, évoluaient ou non d'une manière analogue. Quant à l' α galactosidase, sa présence a été recherchée, mais l'évolution de cette activité hydrolasique n'a pas été suivie au cours de la germination, une thèse de Doctorat ayant déjà été effectuée sur ce sujet (62).

a) Evolution de ces activités au cours de la germination des graines d'Asperge (fig. 36.37.38.39). Les activités osidasiques sont inégalement réparties dans les diverses parties des semences germées. Ainsi, les "parties axiales" deviennent, après un certain développement (20 jours), incapables de provoquer l'hydrolyse du β phényl mannose. Elles possèdent cependant les autres activités hydrolasiques étudiées, et ces activités augmentent régulièrement dans ces organes au cours de la germination.

Les organes de réserve (albumen et cotylédon) peuvent hydrolyser les divers phényl-glycosides. Les activités osidasiques augmentent durant la première partie de la germination, puis diminuent. Dans une graine germée, l'albumen est toujours plus actif que le cotylédon; par contre, si les activités sont exprimées par rapport à 100 mg de matière sèche, le cotylédon est nettement plus actif que l'albumen.

Le cotylédon et les "parties axiales", à la différence de l'albumen, sont dépourvus de glucomannanes. Mais, alors que les "parties axiales" sont sans action sur les glucomannanes et peu actives sur le β phénylmannose, le cotylédon peut provoquer l'hydrolyse de ces substrats. Nous verrons plus loin quelles hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces constatations.

b) Recherche des activités osidasiques dans des semences contenant des réserves de diverses natures. : Les activités osidasiques de semences possédant des réserves de nature variable ont été comparées. Les semences étudiées contenaient, soit de l'amidon (caryopses d'Avoine) soit des lipides et des protéines (graines de Tomate) soit enfin des glucomannanes (graines d'Asperge). Toutes ces semences sont capables d'hydrolyser l' α et le β phényl-glucose, l' α phényl-galactose et l' α phényl-mannose. Seules les semences d'Asperge et d'Avoine sont actives (faiblement d'ailleurs) sur le β phényl-mannose (tableau 36).

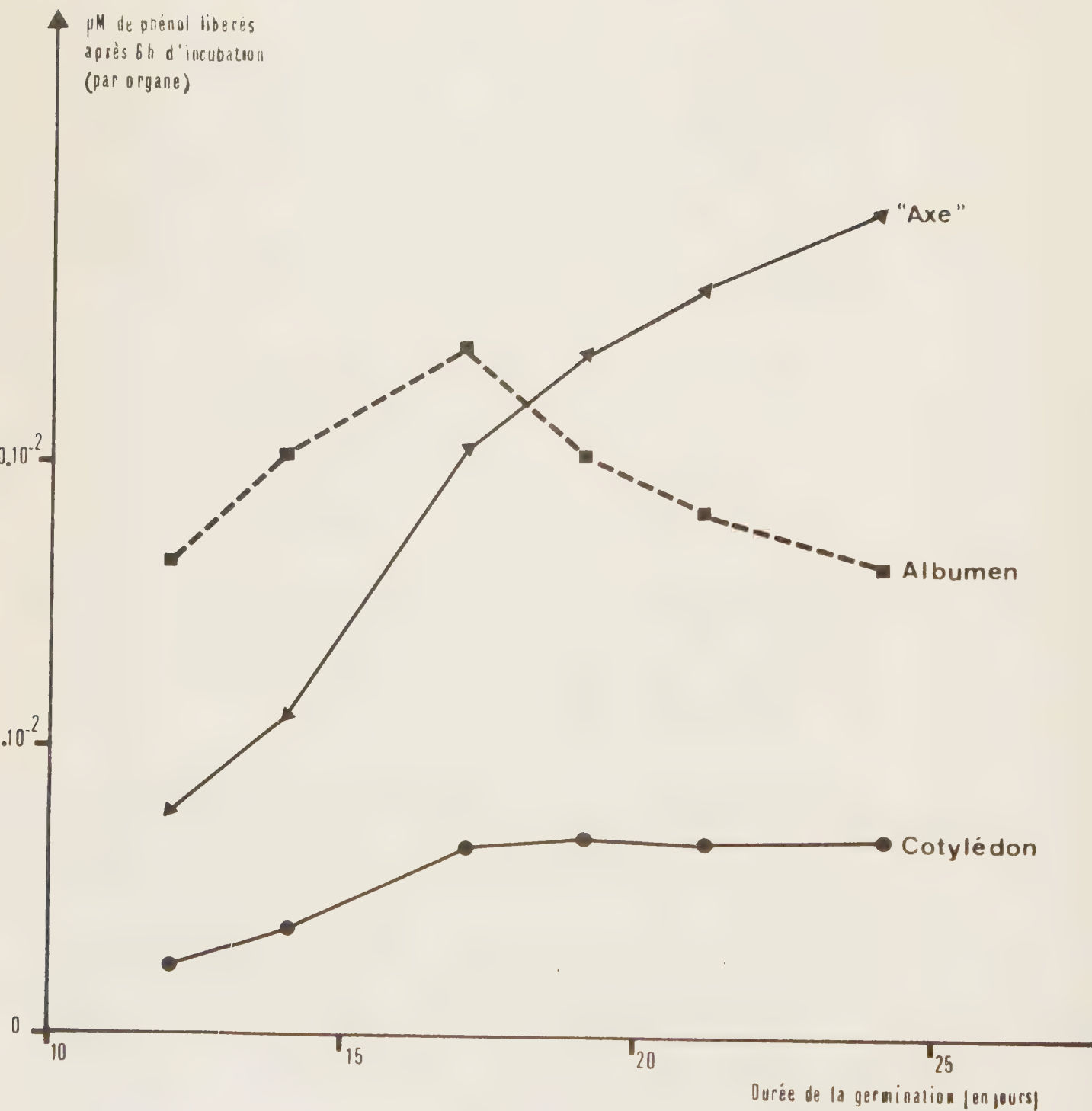


Fig. 36 : Evolution de l'activité α -mannosidasique au cours de la germination des
 graines d'Asperge.

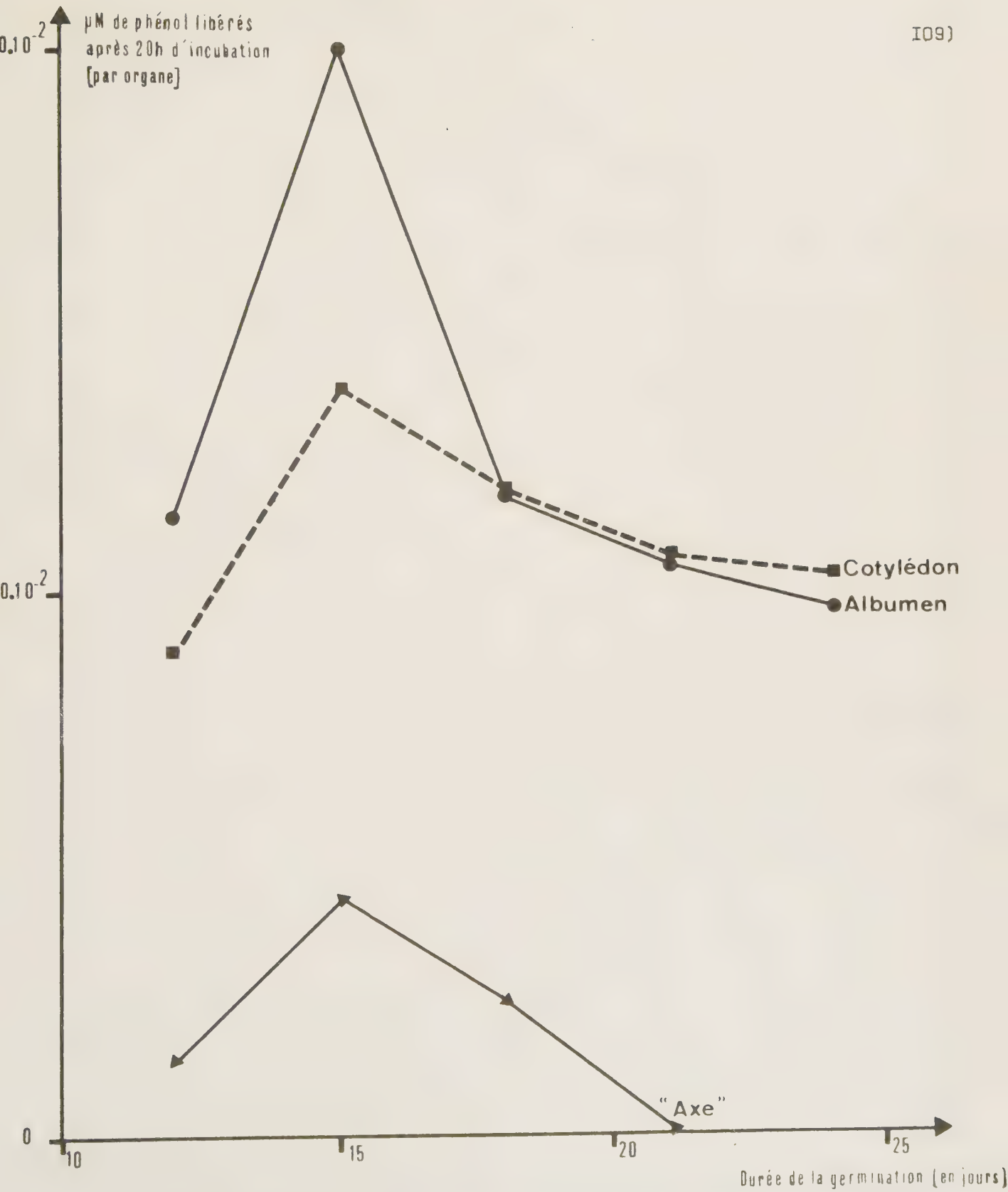


Fig. 37 : Evolution de l'activité β mannosidasique au cours de la germination des graines d'Asperge.

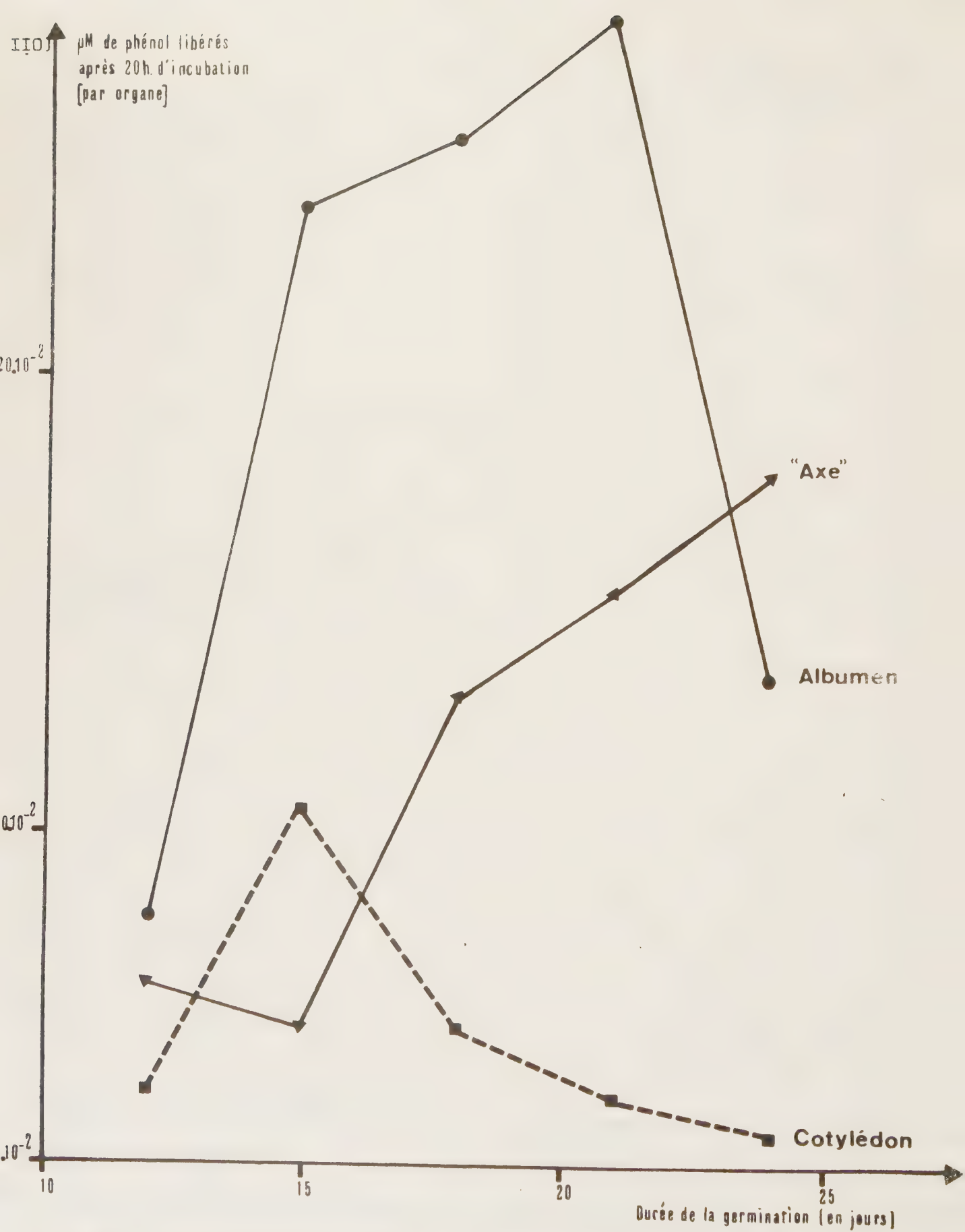


Fig. 38 : Evolution de l'activité α glucosidasique au cours de la germination des

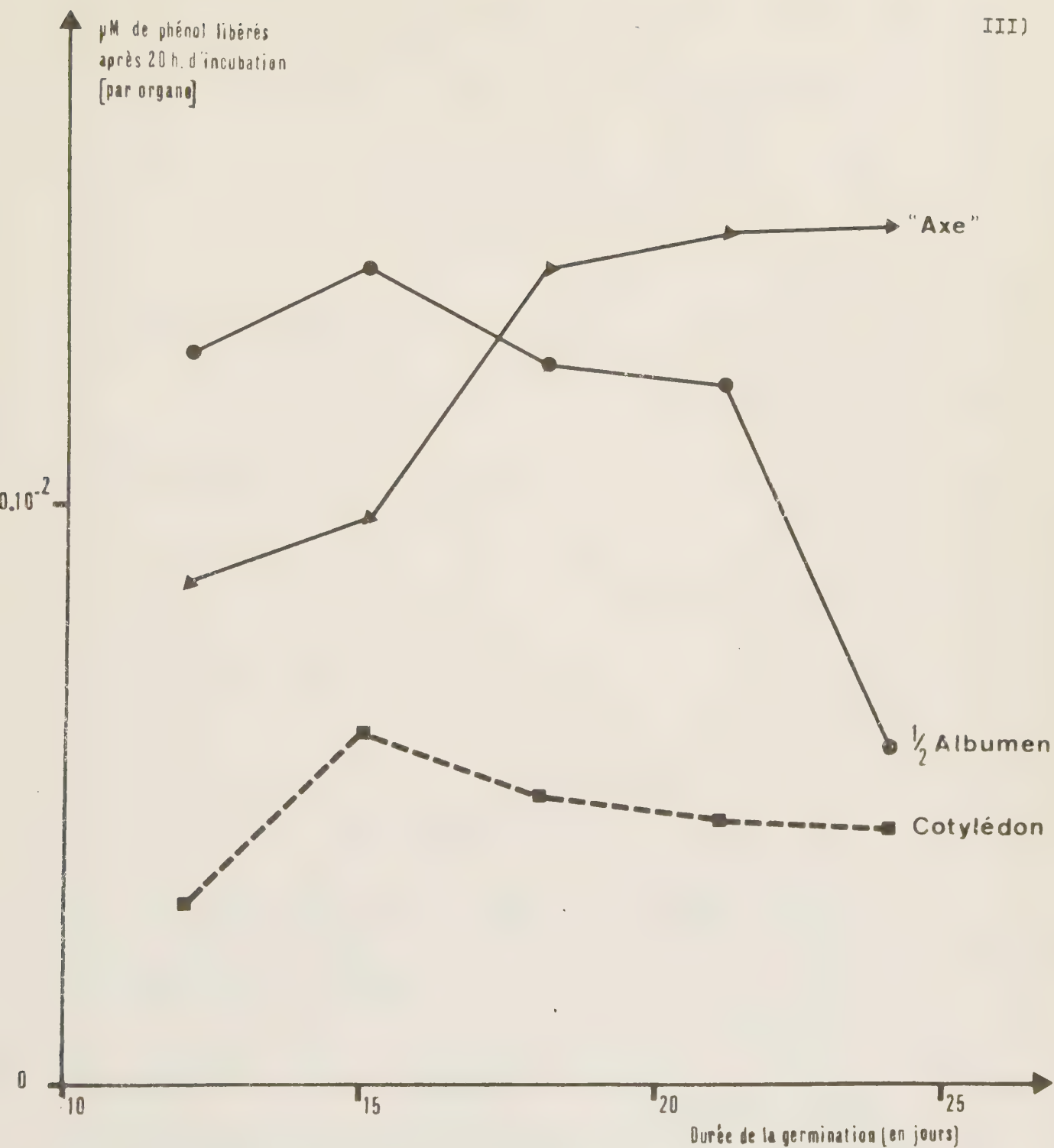


Fig. 39 : Evolution de l'activité β glucosidasique au cours de la germination des semences d'Asperge.

Tableau 36: Activités osidasiques de quelques semences.

Les semences broyées restent six heures à 37° dans du tampon acétate contenant 60 μ M de substrats suivants:

- α ψ G = α phényl-glucoside
- α ψ M = α phényl-mannoside
- α ψ Gal = α phényl-galactoside
- β ψ G = β phényl-glucoside
- β ψ M = β phényl-mannoside

Nature du substrat	α ψ G	α ψ M	α ψ Gal	β ψ G	β ψ M
μ M de substrat hydrolysées en 6h par une semence de:					
Avoine	0,26	1,61	2,21	1,04	0,05
Tomate	0,035	0,23	0,34	0,015	0
Asperge	0,14	2,30	2,31	0,27	0,05
μ M de substrat hydrolysées en 6 h par 100 mg de semence de:					
Avoine	1,06	6,52	8,93	4,20	0,20
Tomate	1,66	10,66	15,92	0,71	0
Asperge	0,75	12,66	12,67	1,50	0,26

c) Evolution de ces activités enzymatiques au cours de la germination
fig. 40.41.42.

- α Activités des " parties axiales " Les parties axiales des semences germées d'Avoine et de Tomate n'ont jamais pu provoquer l'hydrolyse du β phényl-mannose, mais elles sont actives sur tous les autres phényl-glycosides (tout comme les parties axiales des graines germées d'Asperge). Ces activités augmentent régulièrement au cours de la germination.

Fig.40: Evolution de l'activité α glucosidasique au cours de la germination des graines de tomate.

Fig. 41: Evolution de l'activité β glucosidasique au cours de la germination des graines de Tomate.

Les résultats sont rapportés:

a) à un " axe " (A) ou une paire de cotylédons (C)

b) à 100 mg de matière sèche axiale (A') ou cotylédonaire (C')

Fig.42: Evolution de l'activité α mannosidasique au cours de la germination des graines de Tomate.

Pour l'expression des résultats, se reporter à la figure 41.

PM de phénol libérés
après 20 h d'incubation
(par un "axe" ou 2 cotylédons)

 $20,10^{-2}$
 $10,10^{-2}$

Cotylédons

0

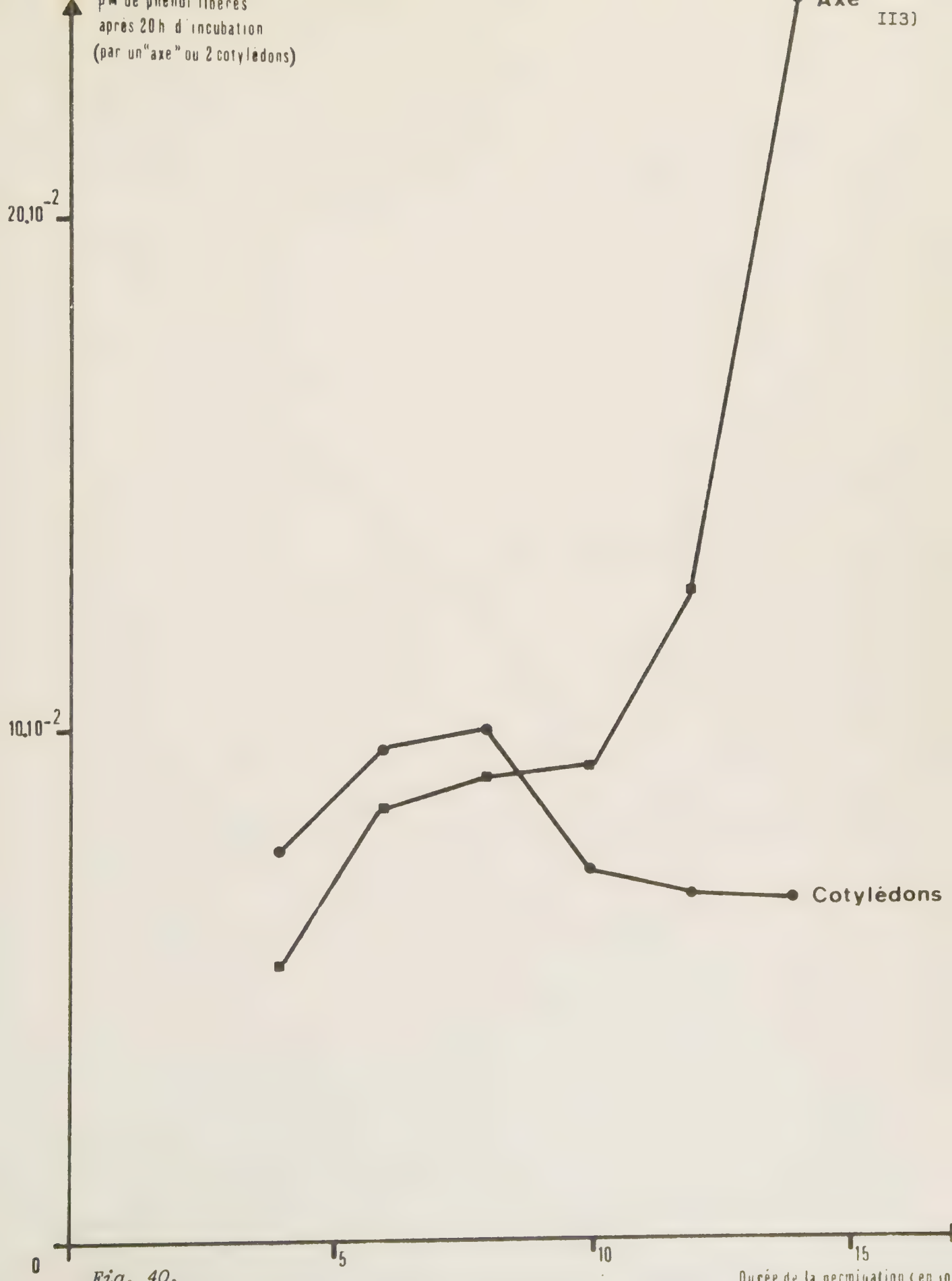
5

10

15

Fig. 40.

Durée de la germination en s



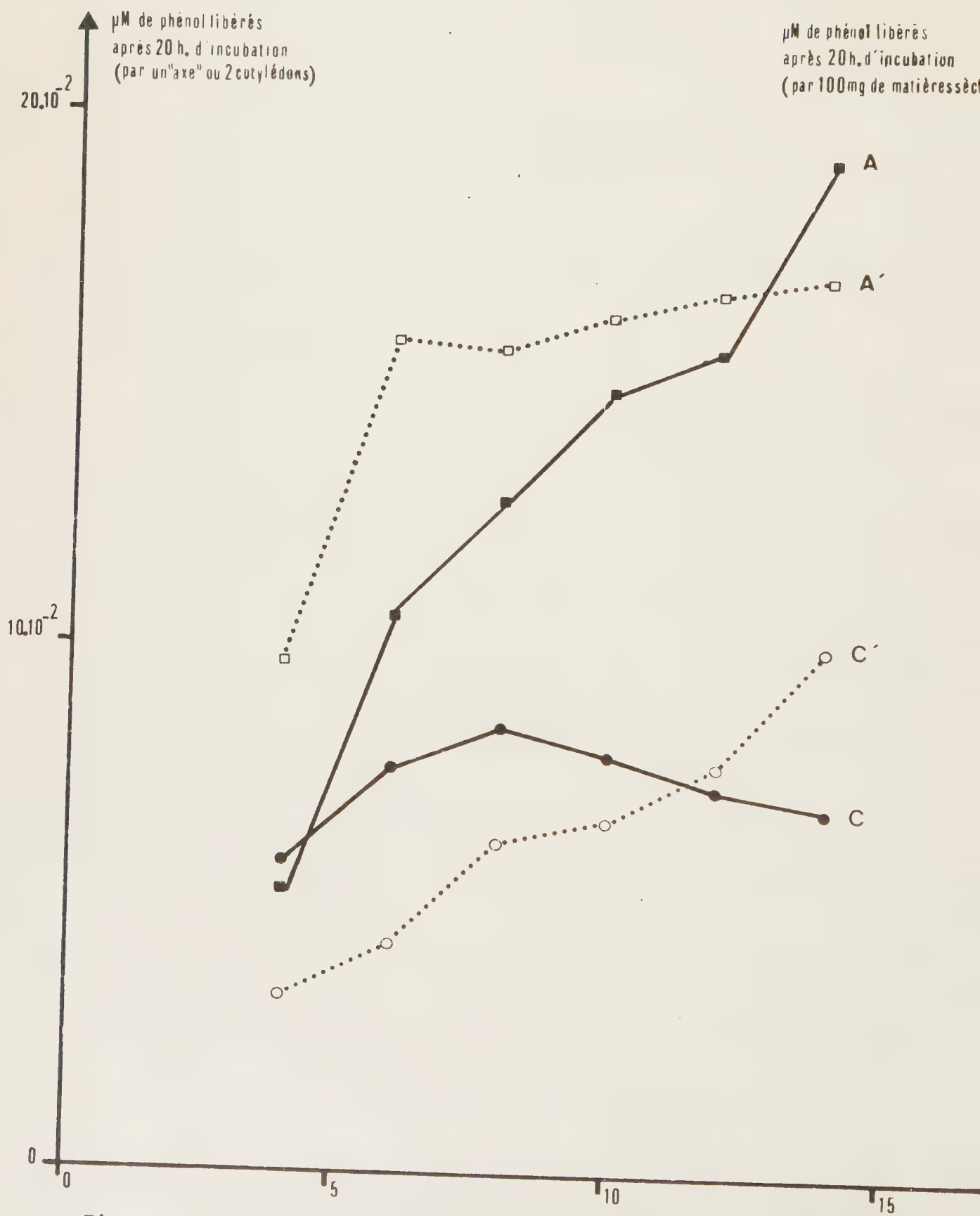


Fig. 4I: Evolution de l'activité de l'enzyme

μM de phénol libérés
après 6 h d incubation
(par un "axe" ou 2 cotyledons)

μM de phénol libérés après 20 h d'incubation
(par 100 mg de matières sèches)

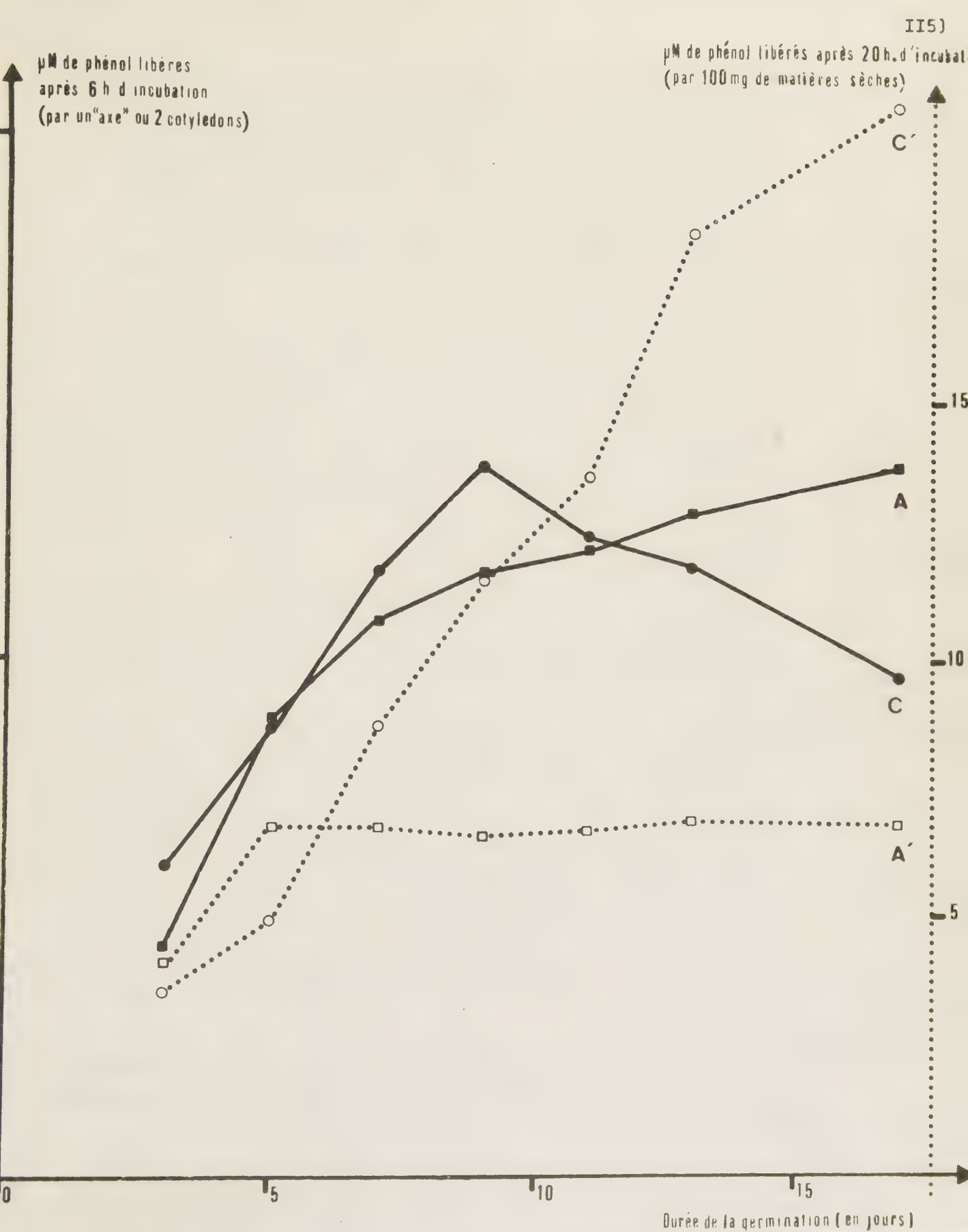


Fig. 42: Evolution de l'activité α mannosidasique au cours de la germination des graines de Tomate.

- β Activités des organes de réserve: les cotylédons des graines germées de Tomate sont sans action sur le β phényl-mannose; les albumens d'Avoine, par contre, montrent une légère activité β mannosidasique (ce fait peut être rapproché de la présence de quantités relativement importantes de galactomannanes dans les caryopses de Graminées (62). Les organes de réserve sont capables d'hydrolyser tous les autres phényl-glycosides. Ces activités hydrolasiques augmentent d'abord, puis diminuent au cours de la germination. D. LECHEVALLIER avait constaté des faits analogues pour l' α galactosidase de diverses semences (62).

L'évolution des activités osidasiques semble donc indépendante de la présence ou de l'absence de glucomannanes. Ces enzymes ont, au cours de la germination, un comportement identique à celui de très nombreuses autres activités enzymatiques (1). Il est intéressant de remarquer que l' α mannosidase est présente dans tous les organes étudiés. Or, il semble admis que le mannose n'existe que sous sa forme β chez les végétaux supérieurs (voir première partie). La β mannosidase, par contre, non seulement ne se rencontre pas partout, mais, de plus, cette enzyme est peu active dans les tissus où elle peut être mise en évidence, du moins dans les conditions expérimentales utilisées (26.65).

La β mannosidase n'a d'ailleurs été signalée que très rarement chez les végétaux supérieurs. L'activité β mannosidasique est peut-être en rapport avec la présence de β mannose sous forme condensée: ainsi les graines de Tomate, très pauvres en mannose, sont également dépourvues d'activité β mannosidasique.

Au cours de la germination des graines d'Asperge, cette enzyme n'a pu être mise en évidence que dans l'albumen et le cotylédon. Or, si l'albumen est constitué essentiellement par des glucomannanes, le cotylédon, lui, est très pauvre en mannose. Il se pourrait que cet organe soit le lieu de synthèse de cette enzyme qui serait ensuite excrétée vers les cellules de l'albumen; de même, au cours de la germination de certaines graminées, des substances synthétisées dans le scutellum sont exorbées vers l'albumen (52). S'il en est ainsi, les activités hydrolasiques doivent être particulièrement intenses dans la zone située entre l'albumen et le cotylédon. La dernière partie de ce travail va nous permettre de confirmer cette hypothèse et de préciser le devenir des produits issus de la dégradation des glucomannanes au cours de la germination des graines d'Asperge.

C) Etude des mécanismes pouvant intervenir " in vivo " dans la dégradation et l'utilisation des glucomannanes au cours de la germination des graines d' Asperge.

Après être parvenu à la conclusion que l'albumen, comme le cotylédon possède les activités enzymatiques pouvant provoquer l'hydrolyse des polysaccharides, il reste encore à préciser les points suivants:

- la " digestion " des polysaccharides se produit-elle bien, comme l'étude histologique permet de le supposer, au niveau de la zone " intermédiaire". Pour répondre à cette question, la composition chimique et les activités enzymatiques de ces différents tissus vont être étudiés comparativement.
- la dégradation des glucomannanes s'effectue-t-elle " in vivo ", comme elle peut se réaliser " in vitro ", c'est-à-dire par hydrolyse? (ainsi que nous l'avons décrit)-
- par quelle voie les produits issus de la dégradation des polysaccharides sont-ils utilisés dans la plantule?

1°) Localisation des phénomènes dégradatifs.

L'étude cytologique et histologique permet de supposer que les membranes squelettiques des cellules de l'albumen sont " digérées" au niveau de la zone intermédiaire. Pour étayer cette supposition, la composition chimique et les activités enzymatiques de l'albumen, du cotylédon et de la zone intermédiaire, vont être comparées.

1) Comparaison de la composition chimique de l'albumen, du cotylédon et de la zone intermédiaire (tableaux 38 et 39).

La composition de l'albumen d'une semence germée rappelle beaucoup celle de la graine non germée avec, comme différence essentielle, l'imbibition qui s'est produite au cours de la germination. Très pauvre en sucres réducteurs libres, l'albumen contient des quantités relativement importantes de saccharose (0,36 mg soit 4% du poids sec) Il est constitué essentiellement par des polysaccharides insolubles contenant autant de glucose que de mannose, ainsi que des traces de galactose.

La composition chimique du cotylédon a déjà été établie précédemment (voir p. 88): riche en glucides solubles (0,45 mg soit 35% du poids sec) et plus précisément en saccharose(le rapport glucose + fructose/ saccharose est inférieur à 1); le cotylédon renferme fort peu de polysaccharides qui sont d'ailleurs ici, de composition très hétérogène.

La composition chimique de la zone de digestion est intermédiaire, mais semble plus proche de celle de l'albumen que de celle du cotylédon. Cette région est riche en eau et en glucides solubles: les sucres réducteurs et le saccharose sont présents en quantité équivalente ; le fructose est plus abondant que le glucose.

La quantité d'hémicelluloses est importante (mais moins que dans l'albumen); leur composition est très voisine de celle de l'albumen, toutefois, si la valeur du rapport mannose/glucose est identique dans les deux cas, l'arabinose et le galactose, presque inexistantes dans l'albumen, apparaissent dans la zone intermédiaire. Les polysaccharides entraînables par l'eau sont par contre voisins de leurs homologues extraits du cotylédon: ils contiennent peu de mannose mais beaucoup d'arabinose et de

Tableau 38: Comparaison de la composition de l'albumen, de la zone intermédiaire et du cotylédon (après seize jours de germination)

Les quantités d'oligosides et de polysaccharides sont exprimées en mg de substances réductrices libérées après hydrolyse acide.

Les résultats sont rapportés à:

- un organe
- 100 mg de matières sèches (m.s)

	Albumen	Zone Intermédiaire	Cotylédon
<u>Poids de matière sèche d'un organe</u> en mg	9,0	0,29	1,28
<u>Quantité d'eau</u> mg par organe	14,20	0,78	6,50
<u>pour 100 mg de matières sèches</u>	158	270	508
<u>Matière insoluble dans l'alcool</u> par organe	7,85	10^{-2} .5,3	10^{-2} .12,5
<u>en mg pour 100 mg de matières sèches</u>	87,22	18,3	9,7
<u>Substances réductrices libres</u> mg par organe	10^{-2} .3,8	10^{-2} .1,08	10^{-2} .7,33
<u>en mg pour 100 mg de matières sèches</u>	0,42	3,7	5,7
<u>Oligosides</u> en mg par organe	10^{-2} .36,2	10^{-2} .4,8	10^{-2} .37,7
<u>en mg pour 100 mg matières sèches</u>	4,0	16,5	29,4
<u>Glucides extraits par H₂O froide</u> en mg par organe	10^{-2} .1,84	10^{-2} .0,14	10^{-2} .0,40
<u>en mg pour 100 mg matières sèches</u>	0,2	0,5	0,3
<u>Glucides extraits par H₂O chaude</u> en mg par organe	10^{-2} .6,10	10^{-2} .0,56	10^{-2} .5,80
<u>en mg pour 100 mg matières sèches</u>	0,7	1,9	1,02
<u>Hémicelluloses</u> en mg par organe	3,15	10^{-2} .7,70	10^{-2} .5,80
<u>en mg pour 100 mg matières sèches</u>	35	26,5	4,5
<u>en mg pour 100 mg de substances insolubles</u>	40	40	21

Tableau 39: Composition chimique des divers polysaccharides de l'albumen, du cotylédon et de la zone intermédiaire (en pourcentages relatifs)

	Arabinose	Xylose	Glucose	Galactose	Mannose
<u>Albumen</u>					
- Polysacch. solubles dans H2O froide	21	5	26	21	26
- Polysacch. solubles dans H2O chaude	21	8	23	14	34
- Hémicelluloses	2	0	48	3	47
<u>Zone intermédiaire</u>					
- Polysacch.extraits par H2O froide	34	12	14	33	7
- Polysacch.extraits par H2O chaude	43	7	8	38	3
- Hémicelluloses	12	1	37	10	40
<u>Cotylédon</u>					
- Polysacch.extraits par H2O froide	25	7	24	32	12
- Polysaccharides extraits par H2O chaude	40	8	9	36	9
- Hémicelluloses	19	18	16	27	19

Enfin, il faut noter que le cotylédon semble complètement dépourvu de mannose libre, alors que l'albumen et la zone intermédiaire en possèdent de faibles quantités.

b) Comparaison des activités enzymatiques (tableau 40)

Si les activités sont rapportées à 100 mg de matière sèche d'albumen, de cotylédon ou de zone intermédiaire, le maximum d'activité (et ce pour toutes les enzymes étudiées) se situe au niveau de la zone intermédiaire et le minimum (si on excepte l'activité polysaccharasique qui, nous l'avons vu précédemment, disparaît du cotylédon en fin de germination) dans l'albumen. Il se pourrait donc que les diverses enzymes soient synthétisées dans le cotylédon, puis rejetées à l'extérieur de celui-ci, c'est-à-dire dans la zone intermédiaire. Toutefois, les activités décelées dans l'albumen sont peut-être dues à une extirpation complète de la zone intermédiaire au cours de la manipulation.

c) Localisation des activités hydrolasiques dans la cellule:

En 1967 KATZ et ORDIN ont montré que des membranes isolées de coléoptiles d'Avoine, incubées avec des hémicelluloses extraites de ces mêmes coléoptiles, étaient capables de provoquer la libération de sucres solubles dans le milieu (55). La très faible étendue de la zone intermédiaire rendait très difficile l'obtention de membranes isolées à partir de ce tissu. C'est pourquoi nous nous sommes contentés d'une expérience préliminaire, effectuée avec des membranes squelettiques obtenues à partir de suspensions cellulaires d'Erable (116) dont nous disposions. Ces parois, incubées avec des glucomannanes extraites de graines d'Asperge provoquent l'apparition d'oses et d'oligosides dans le milieu d'incubation. Il se pourrait donc que certaines hydrolases soient présentes, non seulement dans le cytoplasme, mais également au niveau de la membrane squelettique. Il pourrait en être de même dans le cas des semences d'Asperge en germination. La dégradation des glucomannanes pourrait donc s'effectuer dans la zone intermédiaire par l'intervention d'hydrolases qui attaqueraient les polysaccharides constitutifs des parois cellulaires: la présence de très faibles quantités de mannose libre dans cette région (et non dans le cotylédon) vient renforcer cette hypothèse.

Nous allons maintenant tenter de préciser certains des mécanismes qui interviennent au cours de la dégradation des glucomannanes.

Tableau 40: Activités hydrolasiques de l'albumen, du cotylédon et de la zone intermédiaire (après seize jours de germination).

- Les substrats suivants ont été utilisés:

$\alpha \psi G = \alpha$ phényl-glucoside
 $\beta \psi G = \beta$ phényl-glucoside
 $\alpha \psi M = \alpha$ phényl-mannoside
 $\beta \psi M = \beta$ phényl-mannoside
 $\alpha \psi Gal = \alpha$ phényl-galactoside

- glucomannanes des graines d'Asperge

- Les activités glucosidasiques, mannosidasiques et galactosidasiques sont estimées par le nombre de μ M de substrat hydrolysé en 20 h.
- Les activités osidasiques (Act.osid.) et polysaccharasiques (Act.polys) sont estimées par le nombre de mg d'oses et d'oligosides formés en 20 h, à partir de 40 mg de glucomannanes.
- Les résultats sont rapportés à:
 - 1 organe
 - 100 mg de matières sèches (m.s)

Activité étudiée	$\alpha \psi G$	$\beta \psi G$	$\alpha \psi M$	$\beta \psi M$	$\alpha \psi Gal$	Act. osid.	Act. polys.
<u>Albumen</u>							
- activité d'1 albumen	0,09	0,12	0,50	0,15	0,32	0,42	0,36
- activité de 100 mg .m.s.	0,97	1,33	5,53	1,65	3,46	4,66	4,0
<u>Cotylédon</u>							
- activité d'1 cotylédon	0,03	0,02	0,29	0,14	0,38	0,25	0,03
- activité de 100 mg . m.s.	2,65	1,44	22,85	10,80	29,84	19,5	2,3
<u>Zone intermédiaire</u>							
- activité d'une zone	0,02	0,01	0,36	0,05	0,08	0,11	0,06
- activité de 100 mg.m.s.	6,90	3,45	126,19	19,07	29,13	37,9	20,7

2°) Etude du mécanisme dégradatif.

Nous avons établi précédemment que les graines germées d'Asperge étaient capables d'hydrolyser les glucomannanes. La question d'une intervention possible de phénomènes de phosphorolyse (analogues à ceux qui provoquent la dégradation de l'amidon dans la pomme de terre) n'a cependant pas été abordée. Dans son étude sur la germination des graines de Dattes, KEUSCH (56) avait recherché, en vain, la présence de phosphorylases. Nous avons simplement mis à incuber des glucomannanes et des broyats d'albumens ou de cotylédons, d'une part dans un tampon acétate, d'autre part dans un tampon phosphate (de même pH). Non seulement le tampon phosphate ne permet pas d'obtenir une dégradation plus importante, mais encore il provoque une légère inhibition. Il serait donc peu probable que des phénomènes de phosphorolyse interviennent. Mais ces expériences sont ici trop rudimentaires pour permettre d'apporter une conclusion ferme sur ce point.

Si la dégradation se produit bien sous la forme d'une hydrolyse due aux enzymes que nous avons précédemment mises en évidence (osidases et polysaccharases), il reste encore à préciser à quel niveau interviennent les polysaccharases. Ces enzymes peuvent, soit détacher à chaque extrémité des molécules quelques hexoses ("grignotant" ainsi les glucomannanes), soit rompre les liaisons tous les 2,3 ou 4 hexoses tout au long de la chaîne. S'il s'agit d'un "grignotage" nous devrions trouver dans les graines germées des molécules, dont la composition chimique serait voisine de celle des hémicelluloses, mais de poids moléculaire plus faible. Nous avons donc essayé de séparer par tamisage moléculaire sur gel Sephadex les divers constituants glucidiques d'un extrait aqueux obtenu à partir des organes de réserve (après 18 jours de germination). Cependant, par ces expériences, il n'a jamais été possible d'obtenir de fraction contenant des glucomannanes insolubles dans l'alcool, et de poids moléculaire intermédiaire. De plus, nous avons constaté (voir p. 81) que l'albumen contient du mannose sous une forme soluble, dans les solutions hydroalcooliques, donc du mannose libre ou constitutif d'oligoside. La dégradation des polysaccharides se poursuit donc plus vraisemblablement au niveau de la zone intermédiaire, sous l'action de plusieurs endopolysaccharases et osidases agissant simultanément. A un moment déterminé, seules quelques couches de cellules sont attaquées, ce qui explique pourquoi le mannose libre ne se trouve qu'à l'état de traces; de plus, les hexoses sont vraisemblablement aussitôt métabolisés, c'est pourquoi nous allons maintenant étudier, à l'aide de mannose radioactif, les modes d'utilisation possibles de ce composé.

3°) Etude de l'utilisation du mannose par des graines germées d'Asperge.

a.) Expériences préliminaires: 55 organes de réserve (albumens + cotylédons) sont prélevés à partir de semences ayant germé pendant seize jours, coupés en deux (pour favoriser la pénétration du mannose) et laissés 30 minutes dans 4 ml d'une solution contenant $3 \mu M$ de mannose, 14 C (activité spécifique 2,7 mC/mM.). Les tissus sont ensuite rincés abondamment à l'eau distillée puis, laissés des temps variables dans 4 ml d'eau. Quatre lots, séjournant respectivement 45 mn, 130 mn, 270 mn et 450 mn dans l'eau, ont ainsi été étudiés. Après broyage, le matériel végétal est "fixé" dans l'alcool bouillant et les glucides solubles extraits par trois traitements successifs (2 à l'alcool à 80°, 1 à l'alcool à 60°). Les solutions hydroalcooliques sont déféquées ($SO_4 \cdot Zn$ et baryte) et concentrées afin d'être analysées par chromatographie sur papier. La radioactivité des glucides ainsi séparés est alors mesurée directement. De plus, afin de déterminer l'activité des deux hexoses constitutifs du saccharose, celui-ci est élué à partir des chromatogrammes et hydrolysé par l'invertase; la solution est à nouveau chromatographiée et la radioactivité du glucose et du fructose mesurée. Les "insolubles" dans l'alcool sont séchés dans un dessiccateur et leur radioactivité déterminée dans un compteur à scintillation (PACKARD).

Comme le montre le tableau 41, la radioactivité se retrouve uniquement (et ceci est valable pour tous les lots), dans la fraction hydroalcoolique; il n'y a donc pas eu d'incorporation dans les polysaccharides. Le saccharose devient vite fortement radioactif (48% de la radioactivité totale des graines ayant séjourné 130mn dans l'eau); cette activité se retrouvant aussi bien sur le glucose que sur le fructose. Lorsque la durée du séjour dans l'eau, après incubation avec le mannose marqué, augmente la radioactivité relative du saccharose diminue, mais celle du glucose libre s'élève; ce glucose pourrait peut-être provenir de l'hydrolyse du saccharose, à moins que ce dernier ne soit synthétisé à vitesse plus faible. Les autres oligosides ne sont pratiquement pas radioactifs. Le mannose a donc vraisemblablement été transformé en fructose, le fructose isomérisé en glucose, ces deux hexoses formant alors du saccharose. Il est probable que ces diverses transformations se font par l'intermédiaire de sucres phosphorylés et de nucléotides sucres. Pour nous en assurer, nous allons rechercher si ces composés phosphorylés sont devenus radioactifs.

b.) Mise en évidence de l'intervention de composés phosphorylés. Des graines germées, ayant séjourné 30 mn dans une solution de mannose-14 C, sont traitées plusieurs fois par l'acide formique à 0° (solution à 10%) afin d'extraire les composés phosphorylés (23). La solution obtenue est concentrée, puis analysée par électrophorèse (22) (45 mn - 40 v/cm, tampon citrate pH 5,0) Après séchage, une solution d'acide trichloracétique à 10% est pulvérisée sur le papier; afin d'hydrolyser les composés phosphorylés. On révèle alors, soit le phosphore (par le molybdate d'ammonium); soit la partie glucidique (par le phosphate de p. anisidine). La séparation, bien que médiocre, permet cependant de distinguer trois régions (fig. 43).

Tableau 41: Absorption et transformation du mannose radioactif par des organes de réserve (albumen + cotylédon) âgés de seize jours.

Après incubation de 30 mn dans une solution de mannose radioactif ($10 \mu\text{C}$), les organes de réserve sont lavés, puis laissés des temps variables dans l'eau distillée.

Durée du séjour dans l'eau (en mn) après la période d'introduction du mannose *	45	130	270	450
<u>Activité de l'extrait hydroalcoolique</u>				
- activité globale en cps/mn	80 000	123 400	108 750	42 000
- activité des divers glucides solubles en % de la radioactivité totale de la fraction hydroalcoolique.				
. mannose + fructose	56	47	46	38
. glucose	2	4	7	18
. saccharose	41	48	46	44
. oligofructosides	1	1	1	1
<u>Activité de l'insoluble</u> (dans les solutions hydroalcooliques)	0	0	0	0

a: la ligne de départ sur laquelle sont restés les hexoses
et le saccharose.

b: une région regroupant les sucres monophosphates et l'UDPG
c: une zone contenant des sucres diphosphates.

La majeure partie de la radioactivité se retrouve dans la région a, toutefois, les composés phosphorylés (surtout ceux de la région b, ont également incorporé du mannose radioactif ou un métabolite dérivant du mannose.

Ces composés phosphorylés pourraient intervenir au cours de l'utilisation du mannose issu de la dégradation des glucomannanes. Compte tenu des données bibliographiques les réactions suivantes pourraient se dérouler:

```

mannose 6 phosphate:→fructose 6 phosphate (44.78.97)
fructose 6 phosphate:→glucose 6 phosphate →glucose
                                     1 phosphate
glucose 1 phosphate + UTP → UDPG
UDPG + fructose 6 ph. → saccharose (66)

```

Il nous reste maintenant à préciser les lieux probables de ces diverses transformations dans les graines germées.

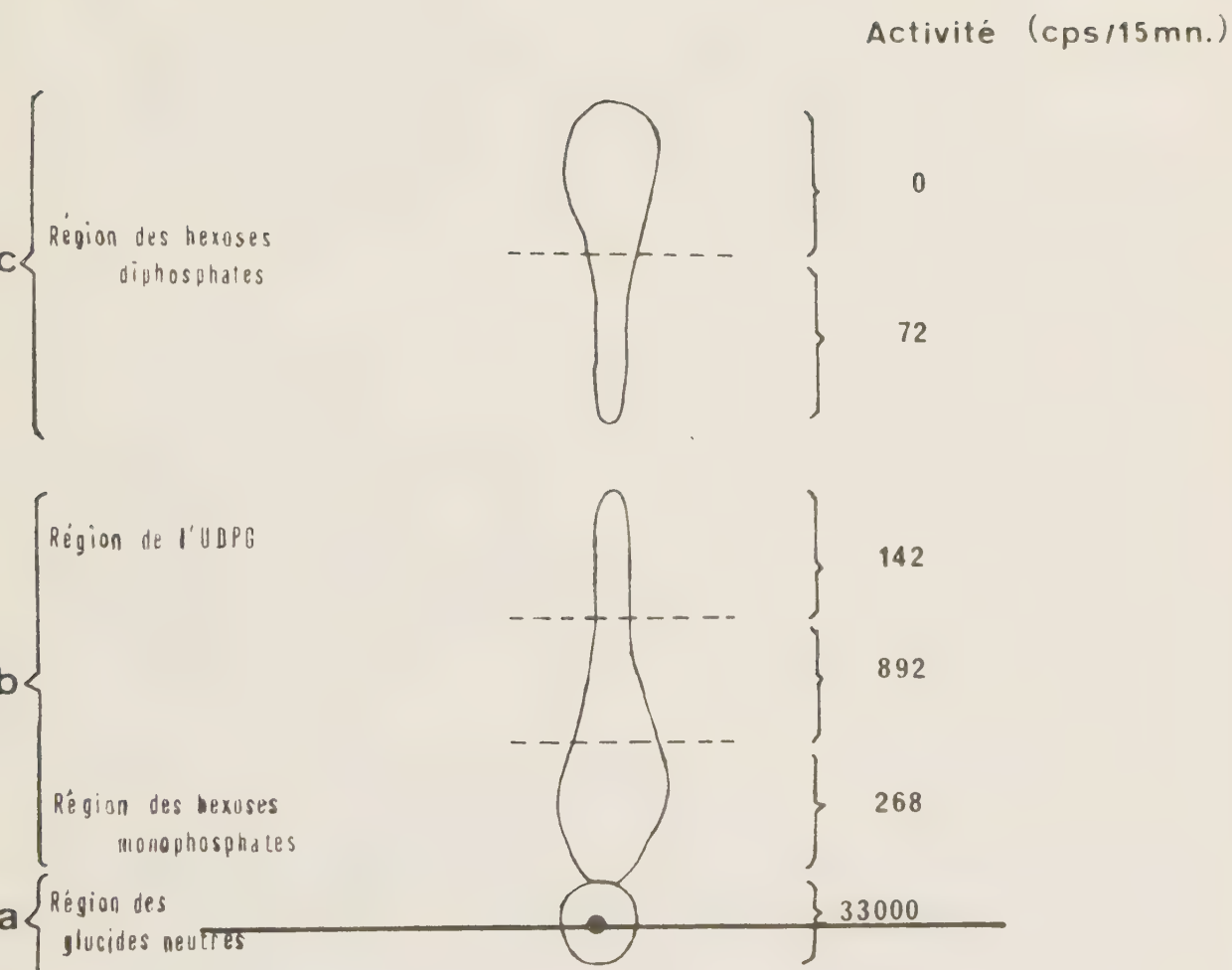


Fig. 43: Electrophorèse de l'extrait formique obtenu à partir de graines d'Asperge germées ayant séjourné 30 mn. dans une solution de mannose radioactif.

c) Etude complémentaire de l'incorporation de mannose radioactif par les différentes parties des organes de réserve.

De très nombreuses graines sont disséquées après seize jours de germination. Le cotylédon, l'albumen et la zone intermédiaire sont prélevés et laissés 30 minutes dans une solution contenant $1 \mu\text{M}$ de mannose 14C (soit $10 \mu\text{Ci}$). Après rinçage, les trois types de tissus restent 30 minutes dans de l'eau distillée, puis sont broyés et fixés dans l'alcool bouillant. Les fractions glucidiques habituelles sont alors extraites et leur radioactivité déterminée. De plus, les différents glucides solubles sont séparés par chromatographie sur papier, et leur activité mesurée. Le saccharose est élué, hydrolysé par l'invertase, la solution obtenue est concentrée et chromatographiée, afin de déterminer la radioactivité de chacun de ses composants.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 42. Plusieurs faits peuvent être constatés :

- 1- zone de transition et le cotylédon (mais non l'albumen) incorporent le mannose dans les polysaccharides. Or, au cours de l'expérience précédente, faite avec des graines non disséquées (albumen + cotylédon en place), aucune trace de radioactivité ne se retrouvait dans " l'insoluble". Ce fait résulte vraisemblablement du rapport existant entre les masses moléculaires des "insolubles" de l'albumen et du cotylédon. (insoluble du cotylédon / insoluble de l'albumen = 8)
- l'albumen absorbe le mannose, mais est incapable de le métaboliser (ou très peu)-
- dans le cotylédon et la zone intermédiaire, par contre, le mannose absorbé est très rapidement transformé; en effet, le saccharose est très fortement marqué (aussi bien sur le glucose que sur le fructose).

Les polysaccharides sont donc non seulement hydrolysés dans la zone de transition, mais, de plus, les produits libérés sont aussitôt transformés sur place en fructose, glucose et saccharose, ce qui explique les très faibles quantités de mannose que nous y avons décelées.

CONCLUSION.

Au cours de la germination des graines d'Asperge, les glucomannanes localisées au niveau des parois des cellules de l'albumen sont dégradées suivant un processus probablement hydrolytique. Cette attaque s'effectue dans une région peu étendue qui se trouve à la limite albumen-cotylédon. Dans cette zone de " digestion " des enzymes (endopolysaccharases et osidases) vraisemblablement synthétisées dans le cotylédon, attaquent les parois qui se sont préalablement imbibées d'eau. Les produits de cette dégradation.

Tableau 42: Absorption et transformation du mannose radioactif par l'albumen, le cotylédon et la zone intermédiaire (après seize jours de germination).

A: Incorporation de la radioactivité dans les diverses fractions glucidiques.

La radioactivité des fractions suivantes a été déterminée:

- A) glucides solubles dans les solutions hydroalcooliques
- B) glucides entraînés par l'eau froide
- C) glucides entraînés par l'eau chaude
- D) " insoluble " après les traitements précédents

Fraction étudiée	A	B	C	D
<u>Incorporation par 200 albumens</u>				
- activité globale de chaque fraction en cps/mn	200 300	0	0	0
- activité spécifique de chaque fraction en cps/mn/mg glucide	2 505	0	0	0
<u>Incorporation par 600 "zones intermédiaires"</u>				
- activité de chaque fraction en cps/mn	111 570	170	63	273
- activité spécifique de chaque fraction en cps/mn/mg.glucide	3 180	203	81	8
<u>Incorporation par 400 cotylédons</u>				
- activité de chaque fraction cps/mn	419 300	451	209	278
- activité spécifique de chaque fraction en cps/mn/mg. glucide	2 330	282	47	14

B: Incorporation dans les divers glucides solubles (fraction A)

Les activités sont exprimées en % de la radioactivité totale de cette fraction.

Glucides étudiés	Mannose + Fructose	Glucose	Saccharose	Oligoside
Albumen	91	6	3	0
Zone intermédiaire	71	3	26	0
Cotylédon	54	5	41	0

sont aussitôt métabolisés, probablement par l'intermédiaire de composés phosphorylés, le saccharose représentant sans doute la forme de migration de ces nouveaux métabolites. Les zones externes de l'albumen, non encore attaquées, conservent un métabolisme extrêmement réduit.

- CONCLUSIONS GENERALES ET DISCUSSION -

Les expériences relatées dans ce mémoire se rapportent aux polysaccharides à mannose des graines de quelques Liliacées, sous le double aspect biochimique et physiologique. Divers auteurs (6.28.99) avaient déjà signalé la présence de glucomannanes dans des semences d'espèces appartenant à des familles voisines et, dans certains cas, déterminé la composition chimique de ces " hémicelluloses ". Cependant, rares furent les chercheurs qui s'intéressèrent au rôle des polysaccharides au cours de la germination. Dans ces conditions, nous avons tenu à étudier, d'une part la composition chimique et la structure des " hémicelluloses " à mannose de certaines semences, d'autre part l'évolution de ces composés au cours de la maturation et de la germination des graines tant d'un point de vue biochimique, que d'un point de vue histologique et cytologique. Enfin, une partie de ce travail a été consacrée à rechercher, autant que faire se peut, les mécanismes intervenant au cours de la dégradation des polysaccharides.

Pour mener à bien ces expériences, une technique permettant d'estimer les différents glucides présents dans une solution s'est rapidement révélée indispensable. En 1963, SWEELEY (105) et ses collaborateurs avaient signalé les avantages présentés par la séparation par chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthysilyls des glucides. Après "miniaturisation" de leur méthode, nous avons largement utilisé ce procédé d'analyse. De plus, cette technique appliquée dans des conditions expérimentales bien précises, a pu aboutir au dosage de chaque ose chromatographié. Voyons maintenant les principaux résultats qui ont pu ainsi être obtenus afin de les comparer aux données bibliographiques.

1°) Etude des composés à mannose contenus dans les semences de certaines Liliacées.

Des quantités importantes " d'hémicelluloses ", comprenant du mannose dans leur molécule, ont été mises en évidence dans des semences appartenant à diverses espèces de Liliacées. La composition chimique de ces polysaccharides a été établie en utilisant un ensemble de techniques " biologiques " (hydrolyses enzymatiques) ou physico-chimiques (méthylation des groupements OH pour déterminer les divers "branchements" des molécules, tamisages moléculaires, etc..) Nous avons ainsi montré que les graines d'Asperge contiennent des glucomannanes. Ces molécules sont constituées par l'enchaînement

d'un grand nombre de maillons (environ 800) de β glucose et de β mannose; de s molécules d' α galactose peuvent occuper les extrémités. Les graines de Jacinthe contiennent des glucomannanes constituées par le même type d'enchaînement mais, alors que les polysaccharides extraits des graines d'Asperge, renferment autant de glucose que de mannose, les glucomannanes des semences de Jacinthe semblent être de deux types, différant par la valeur du rapport mannose/glucose.

Les polysaccharides sont localisés dans l'albumen, au niveau des parois squelettiques, et représentent le principal constituant des membranes secondaires. La cellulose, en effet, est rare et limitée à la membrane primaire. Les composés pectiques, pratiquement inexistant, ne se trouvent qu'au niveau de la lamelle moyenne très réduite. Les glucomannanes sont présentes sous forme fibrillaire, comme le montrent les images obtenues en microscope électronique après action brève d' H_2O_2 . La biréfringence en lumière polarisée des parois cellulaires de l'albumen, comme celle des glucomannanes purifiées, vient confirmer cette hypothèse. De plus, chaque microfibrille est elle-même constituée par l'assemblage d'un certain nombre de "fibrilles unitaires". Les spectres de diffraction de rayons X par les polysaccharides permettent de supposer que ces hémicelluloses possèdent une structure plus ou moins cristalline.

Les polysaccharides des graines d'Asperge et de Jacinthe ont donc une composition chimique (5) et une structure (61) analogues à celles des semences de familles voisines. Des composés identiques ont été isolés d'organes de réserve d'autres Monocotylédones (46.28.89). Ces polysaccharides semblent rares par contre, chez les Dicotylédones, qui possèdent surtout des galactomannanes (110).

2°) Evolution des glucomannanes au cours de la maturation et de la germination.

a) maturation des graines de Jacinthe. Alors que dans les fruits (capsules) s'accumulent des polymères du xylose, dans les graines s'élaborent de grandes quantités de glucomannanes. Des polysaccharides solubles dans l'eau et dont la composition chimique est très voisine de celle des "hémicelluloses" insolubles, ont été isolés de graines immatures. Ces composés, de masse moléculaire relativement faible, pourraient être des intermédiaires au cours de la synthèse des glucomannanes. Après incubation de graines immatures dans une solution de mannose radioactif, l'activité des fractions aqueuses extraites de ces graines, et contenant ces composés, est d'ailleurs relativement élevée comparée à celle des polymères insolubles.

Au cours de la maturation des graines, les glucomannanes se déposent d'abord en certains points, autour de la membrane primaire. Les plages de membrane secondaire, ainsi constituées, entourent progressivement toutes les cellules de l'albumen.

Dans les graines très jeunes, la synthèse des polysaccharides membranaires semble s'effectuer au contact de la paroi, dans des anfractuosités limitées par des replis de la membrane plasmique. Dans les graines plus âgées, les cellules de l'albumen possèdent un appareil de Golgi bien développé, dont les vésicules, remplies de substances glucidiques, migrent vers la membrane ectoplasmique, puis se vident de leur contenu au contact de la paroi. Tout se passe donc comme si les vésicules golgiennes apportaient des composés de masse moléculaire relativement faible, la polymérisation s'effectuant alors directement au contact de la paroi qui s'accroît ainsi par l'adjonction de nouvelles molécules de polysaccharides, dont la structure fibrillaire est apparente dans les graines très jeunes. Les diverses images, obtenues au microscope électronique, mettent toutes en relief l'importance de ces replis de la membrane plasmique, replis dans lesquels semble bien s'effectuer la synthèse ou au moins la polymérisation (dans le cas de graines plus âgées) des glucomannanes. Ces divers résultats concordent avec l'existence et le rôle des fossettes sécrétrices décrites par BUVAT (19), puis par ROLAND(92.94). De plus, l'activité synthétisante élevée de la membrane ectoplasmique rapportée récemment par VILLEMEZ et ses collaborateurs (111.112), est un argument supplémentaire en faveur de la localisation des réactions de synthèse que nous proposons. Ceci n'est pas en contradiction avec les données classiques qui insistent sur le rôle de l'appareil de Golgi (86.114) puisque nous avons vu que, dans les graines âgées, certaines réactions de synthèse s'effectuaient vraisemblablement dans les vésicules golgiennes. Ces synthèses font certainement intervenir des nucléotides sucres et en particulier le GDPM (31.32). Les enzymes qui permettent la synthèse de ce composé ont d'ailleurs été isolées des bactéries (87) puis, des végétaux supérieurs (8). L'hypothèse de l'intervention de composés hydrosolubles, de masse moléculaire relativement faible, a également déjà été avancée (54.102).

- b) germination des graines d'Asperge. Au cours de la germination, à la lumière comme à l'obscurité, les polysaccharides constitutifs des parois cellulaires de l'albumen disparaissent progressivement. Entre l'albumen et le cotylédon apparaît, vers le septième jour de germination, une zone intermédiaire qui prend naissance aux dépens des couches les plus internes de l'albumen. Puis, au fur et à mesure que se déroule la germination, cette zone, dont l'étendue demeure à peu près constante, se trouve déplacée vers les couches cellulaires externes de l'albumen. Les régions ainsi digérées sont remplacées par l'accroissement du volume du tissu cotylédonaire: ce dernier s'étend alors sur tout l'espace préalablement occupé par l'albumen. Dans les graines germées d'Asperge, les cellules les plus internes de l'albumen se vident progressivement. Leurs parois se gonflent, perdent leur structure, et finissent par former un ensemble gélifié. La périphérie du cotylédon se trouve ainsi " tapissée " par une couche de débris membranaires.

Une expérience préliminaire nous a montré que des parois isolées (à partir de suspensions cellulaires d'Erable) pouvaient détacher des oses et des oligosides à partir des glucomannanes. Or, nous avons constaté qu'au cours de la germination des graines d'Asperge, les cellules les plus internes de l'Albumen perdent rapidement toute structure et se vident de leur contenu, restant réduites aux parois (ou plutôt à des fragments de parois). Il semble donc possible que les hydrolases, qui sont pourtant des enzymes "solubles" puissent se trouver également au niveau des membranes squelettiques.

Après incubation dans une solution de mannose radioactif, le cotylédon et la zone intermédiaire incorporent très rapidement le mannose et le transforment en saccharose. L'albumen, par contre, semble dépourvu des enzymes actives, nécessaires à la transformation mannose → saccharose. Cette transformation doit se faire par une série de réactions au cours desquelles interviennent des composés phosphorylés (sucres phosphates et UDPG). Le saccharose qui possède un "turn over" rapide représente sans doute la forme utilisable, mobile des réserves.

On sait par ailleurs que la dégradation des polysaccharides végétaux a été étudiée par divers auteurs (11.20.25.68). Les phénomènes de phosphorolyse qui interviennent parfois: exemple au cours de l'utilisation de l'amidon (2) ou du paramylon (42) semblent être assez limités. Ainsi, STONE (103), dans une mise au point récente, met en avant le rôle des glucanases. De même, KATZ et ORDIN (55), étudiant la dégradation des substances membranaires du coléoptile d'Avoine, concluent à l'intervention de plusieurs saccharases et osidases. KEUSCH, enfin, analysant les processus d'utilisation des mannanes de Dattes, avait cherché, en vain, à mettre en évidence des activités phosphorylasiques dans les graines de Dattes germées (56). Des hydrolases pouvant attaquer des polymères du mannose ont été isolées des champignons (69.70.90) et de végétaux supérieurs (21). Ces mannanases peuvent hydrolyser, aussi bien des mannanes que des galactomannanes. On peut penser qu'il en est ainsi dans les semences que nous avons étudiées.

La localisation des hydrolases dans les cellules a fait l'objet de nombreux travaux (12.17.36.58). En 1965, SASSEN (95) a montré que les enzymes provoquant l'hydrolyse des parois cellulaires sont apportées par des vésicules golgiennes qui s'incorporent aux parois. Par ailleurs, LEE et KIVILAN d'une part (63), KATZ et ORDIN d'autre part (55) ont montré que des parois isolées pouvaient provoquer l'hydrolyse des substances membranaires. Les hydrolases pourraient donc bien être localisées, comme nous le supposons, au niveau des parois squelettiques.

Dans les graines d'Asperge, les hexoses obtenus lors de la dégradation des polysaccharides sont aussitôt transformés en saccharose. Ce composé semble d'ailleurs souvent représenter la forme utilisable des réserves glucidiques, que ces réserves soient des mannanes (56) ou de l'amidon (104). Nous avons constaté que cette transformation mannose $\longrightarrow$ saccharose ne pouvait se réaliser dans l'albumen, ce qui est en accord avec les travaux de MURATA (76) sur la localisation de l'activité saccharose synthétase au cours de la germination des caryopses de Riz. Compte tenu des données bibliographiques, on peut penser que la transformation mannose $\longrightarrow$ saccharose débute par une isomérisation du mannose en fructose. Cette réaction est réalisée par l'intervention d'une mannose isomérase (19.81) ou d'une mannose phosphate isomérase (44.97).

En résumé, l'ensemble de notre travail a permis d'établir la composition chimique des polysaccharides de certaines semences de Liliacées et de préciser leur mode d'utilisation au cours de la germination ainsi que certains aspects cytologiques de leur synthèse au cours de la maturation des graines. Les espèces étudiées pourraient représenter un matériel de choix pour des travaux portant sur l'étude, tant cytologique que biochimique, des mécanismes de synthèse des parois. Il serait également intéressant de poursuivre l'analyse des constituants membranaires d'un point de vue taxonomique, ce genre de recherches n'ayant guère été entrepris récemment (37).

-BIBLIOGRAPHIE.-

- I. AGRAWAL K.L.M., BAHL D.P.- Glycosidases of Phaseolus vulgaris. II: Isolation and general properties. J. Biol. Chem. (1968), 243, 103.
2. AKAZAWA T.- Starch, Inulin and other reserve polysaccharides. In Plant Biochemistry. New York Acad. Press. (1965), 258.
3. ANDREWS P., HOUGH L., JONES J.K.N.- Mannose containing polysaccharides. Part II: The galactomannan of Fenugreek seed (Trigonella foenum graecum). J. Chem. Soc. (1952), 2744.
4. ANDREWS P., HOUGH L., JONES J.K.N.- Mannose containing polysaccharides. I: The galactomannans of Lucerne and Clover seeds. J. Amer. Chem. Soc. (1952), 74, 4029.
5. ANDREWS P., HOUGH L., JONES J.K.N.- Mannose containing polysaccharides. III: The polysaccharides of the seeds of Iris ochroleuca and Iris sibirica. J. Chem. Soc. (1953), 1186.
6. ANDREWS P., HOUGH L., JONES J.K.N.- Mannose containing polysaccharides. IV: The glucomannans of lily bulbs. J. Chem. Soc. (1956), 181.
7. ASPINALL G.O., HIRST E.L., PERCIVAL E.G.V., WILLIAMSON I.R.- The mannans of Ivory nut (Phytelphas macrocarpa). I: The methylation of Mannan A and Mannan B. J. Chem. Soc. (1953), 3184.
8. ASUA L., CARMINATI H., PASSERON S.- Guanosine diphosphate-D-mannose pyrophosphorylase from Gleditschia macracantha. Bioch. Biophys. Acta. (1966), 128, 582.
9. BACON J.S.D.- The oligofructosides. Bull. Soc. Chim. Biol. (1960), 42, 1441.
10. BAILEY R.W., HASSID W.S.- Xylan synthesis from Uridine diphosphate-D-xylose by particulate preparations from immature corn cobs. Proc. Nat. Acad. Sci. (1966), 56, 1586.
11. BAILEY R.W., GAILLARD B.D.E.- Hydrolysis of plant mannans by rumen protozoal enzymes. Austr. J. Biol. Sci. (1969), 22, 267.
12. BALZ H.P.- Intrazelluläre Localization und Funktion von hydrolytischen Enzymen bei Tabak. Planta. (1966), 70, 207.
13. BARBER G.A., ELBEIN A.D., HASSID W.Z.- The synthesis of cellulose by enzyme system from higher plants. J. Biol. Chem. (1964), 239, 4056.
14. BISHOP C.T., COOPER F.P.- Constitution of a glucomannan from Jack pine (Pinus banksiana, Lamb.). Can. J. Chem. (1960), 38, 793.
15. BOURDU R.- L'inuline dans le Dahlia au cours de la germination et au début du développement de la plante. Bull. Soc. Franc. Physiol. vég. (1964), 10, 145.

16. BRAWERMAN G., CHARGAFF E.- On the synthesis of nucleotides by nucleoside phosphotransferases. Bioch. Biophys. Acta. (1961), 15, 549.
17. BROWN H.D., CHATTOPADHYAY S.K., PATEL A.- Characteristics of an ATPase in membrane particles, solubilized and linked to a cellulose matrix. Enzymologia, (1967), 32, 205.
18. BUCHER H.- Die Struktur der Tertiärwand von Holzfasern. Holzforsch. (1957), II, 97.
19. BUVAT R. Comportement des membranes plasmiques lors de la différenciation des parois latérales des vaisseaux (métaxylème de Cucurbita pepo). (1964), C. R. Acad. Sci. Paris, 258, 55II.
20. CLARKE A.E., STONE B.A.- Properties of a (1→4) glucan hydrolase from Aspergillus niger. Biochem. J. (1965), 96, 802.
21. CLERMONT-BEAUGIRAUD S., PERCHERON F.- Etude du mode d'action de la β mannanase des semences germées de Fenugrec. Bull. Soc. Chim. Biol. (1960), 50, 633.
22. CLOTTEN R.- Hochspannungselectrophorese. G.Thieme Verlag, Stuttgart. (1962).
23. COLE C.V., ROSS C.- Extraction, separation and quantitative estimation of soluble nucleotides and sugar phosphates in plant tissues. Anal. Biochem. (1966), 17, 526.
24. COURTOIS J.E., ANAGNASTOPOULOS C., PETEK F.- Recherches sur les galactomannanes. I: Isolement d'une galactomannane de la luzerne et hydrolyse partielle par 1% galactosidase du café. Bull. Soc. Chim. Biol. (1958), 40, 1277.
25. COURTOIS J.E., LE DIZET P.- Recherches sur les galactomannanes. IV: Action de quelques préparations enzymatiques sur les galactomannanes de Trèfle et de Gleditschia. Bull. Soc. Chim. Biol. (1963), 45, 743.
26. COURTOIS J.E., LE DIZET P.- Etude des oligomannosides obtenus par hydrolyse partielle de la mannane d'un palmier. Bull. Soc. Chim. Biol. (1964), 46, 535.
27. CURTIS J.C., CANTLON J.E.- Cell wall of Melampyrum lineare seed: carbohydrate components. Science, (1966), 151, 580.
28. DALOUL M., PETEK F., COURTOIS J.E.- Etude des glucomannanes du salep de Syrie. Bull. Soc. Chim. Biol. (1963), 45, 1247.
29. DAVISON P.K., YOUNG R.- Gas chromatography of carbohydrates. The quantitative determination of the free sugars of plants as their trimethylsilyl ethers. J. Chrom. (1968), 41, 12.
30. DREYWOOD R.- Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Eng. Anal. Edit. (1967), 18, 499.
31. ELBEIN A.D., HASSID W.Z.- The enzymatic synthesis of a glucomannan. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1966), 23, 311.

32. ELBEIN A.D.- Biosynthesis of a cell wall glucomannan in mung bean seedlings. J. Biol. Chem., (1969), 244, 1608.
33. FEINGOLD D.S., NEUFELD E.F., HASSID W.Z.- Xylosyl transfert catalized by an Asparagus extract. J. Biol. Chem. (1959), 234, 488.
34. FETEKE M.A.R.de, LELOIR L.F., CARDINI C.E.- Mechanism of starch biosynthesis. Nature, (1960), 187, 918.
35. FRYDMAN R.B., CARDINI C.E.- Studies on the biosynthesis of starch.I: Isolation and properties of the soluble Adenosine diphosphate glucose:starch glucosyl transferase. Arch. Bioch. Bioph. (1966), 116, 9.
36. GAHAN P.B.- Subcellular localization and function of hydrolases in differentiating plant cells. Biochem. J., (1969), 111, 278.
37. GAILLARD B.D.E.- Comparison of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. Phytochem. (1965), 4, 631.
38. GOLDBERG R.- Etude des glucosidases et mannosidases de quelques semences. C. R. Acad. Sci. Paris. (1967), 264, 1036.
39. GOLDBERG R.- Etude de l'évolution des "hémicelluloses" au cours de la germination des graines d'Asparagus officinalis. C.R. Acad. Sci. Paris.(1967), 264, 2899.
40. GOLDBERG R.- Etude des polysaccharides des graines et des fruits d'Endymion nutans Dumort. au cours de la maturation. C. R. Acad. Sci. Paris. (1969), 268, 1190.
41. GOLDBERG R. Etude des polysaccharides de réserve de deux graines de Liliacées: Asparagus officinalis L. et Endymion nutans Dumort. Phytochem. (1969), 8, 1783.
42. GOLDEMBERG S.H., MARECHAL L.R., DE SOUZA B.C.- β 1,3 oligoglucan:orthophosphate glucosyltransferase from Euglena gracilis. J. Biol. Chem. (1966), 241, 45.
43. GORET M.- Etude chimique et physiologique de quelques albumens cornés de graines de Légumineuses. Thèse Doct. Univ. Pharm. Paris. (1901);
44. GRACY R.W., NOLTMANN .- Studies on phosphomannose isomerase. J. Biol. Chem. (1968), 243, 3161.
45. HAWORTH W.N.- A new method for preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc. (1915), 107, 8.
46. HAYASHI K., NAGATA J., MIZUNO T.- Studies on the carbohydrate from the bulb of Lycoris radiata Herbert. I: Glucomannan. J. Agric. Chem. Soc. Japan. (1953), 27, 234.
47. HELFERICH B., WINKLER S.- Die synthese von α und β Phenol-d-mannosid. Ber. dtische. Chem. Ges. (1933), 66, 1556.
48. HERISSEY H.- Recherches chimiques et physiologiques sur la digestion des mannanes et des galactanes, par la séminase, chez les végétaux. Thèse Doct. Sci. Paris. (1903).

49. HIRST E.L., JONES J.K.N., WALDER W.O.- The galactomannan of the Lucerne seeds. J. Chem. Soc. (1947), I443.
50. HUDSON C.S., DALE J.K.- The isomeric pentaacetates of mannose. J. Amer. Chem. Soc. (1915), 37, I280.
51. INGLE J., BEEVERS L., HAGEMAN R.H.- Metabolic changes associated with the germination of corn. I: Changes in weight and metabolites and their redistribution in the embryo axis, scutellum, and endosperm. Plant Physiol. (1964), 39, 735.
52. INGLE J., HAGEMAN R.H.- Metabolic changes associated with the germination of corn. III: Effects of gibberellic acid on endosperm metabolism. Plant Physiol. (1965), 40, 672.
53. JOHNSON J.A.- Synthesis of potential anticancer agents. VI: Use of O-benzoyl blocking group for synthesis of 6-Chloropurine nucleosides. J. Org. Chem. (1957), 22, 954;
54. KATZ M., ORDIN L.- Metabolic turnover in cell wall constituents of Avena sativa coleoptile sections. Biochem. Biophys. Acta. (1967), 141, II8.
55. KATZ M., ORDIN L.- A cell wall polysaccharide hydrolysing enzyme system in Avena sativa L. coleoptiles. Biochem. Biophys. Acta. (1967), 141, I26.
56. KEUSCH L.- Die Mobilisierung des Reservemannans in keimenden Dattelsamen. Planta. (1968), 78, 321.
57. KIMURA M., TOHMA M., OKAZAWA Y., MURAI N.- Quantitative determination of mono and oligosaccharides in potato tubers by gas liquid chromatography. J. Chrom. (1969), 41, I10.
58. KIVILAN A., CABRERA BEAMAN T., BANDURSKI R.S.- Enzymic activities associated with cell wall preparations from corn coleoptiles. Plant Physiol. (1961), 36, 605.
59. KLEINSCHMIDT M.G., DOBRENZ A.K., Mc MAHON V.A.- Gas chromatography of carbohydrates in Alfalfa nectar. Plant Physiol. (1968), 43, 665.
60. KOCH F.C., Mc MEEKIN T.L.- A new nesslerization micro-Kjeldahl method and a modification of the Nessler Folin reagent for ammonia. J. Amer. Chem. Soc. (1924), 46, 2066.
61. KOOIMAN P., KREGER D.R.- Some observations on X-ray diffraction and monosaccharide composition in mannose containing polysaccharides from seeds, Kkl. Neder. Akad. Wetensch. Proc. serie C. (1960), 63, 634.
62. LECHEVALLIER D.- Etude biochimique et physiologique de l'α galactosidase dans les semences. Thèse Doct. Sci. Paris. (1966).
63. LEE S., KIVILAN A., BANDURSKI R.S.- In vitro autolysis of plant cell walls. Plant Physiol. (1967), 42, 968.
64. LEE C.Y., Mc REE T.E., SHALLENBERGER R.S.- Mutarotation of D-glucose and D-mannose in aqueous solutions. Carb. Res. (1969), 9, 356.

65. LE DIZET P.- Etude de la mannane de Phoenix canariensis. Thèse Ing. Doct. Paris. (1963).
66. LELOIR L.F., CARDINI C.- The biosynthesis of sucrose. J. Amer. Chem. Soc. (1953), 75, 6084.
67. LINDBERG B., MEIER H.- Studies on glucomannans from Norwegian spruce. Isolation and physical properties. Svensk Pappers Tidng. (1957), 60, 785.
68. LUCHSINGER W.W., CHEN S., RICHARDS A.W.- Mechanism of action of malt β glucanases. 8: Structure of products formed during hydrolysis of barley β D-glucan by A_{II} -endo-glucanases. Arch. Bioch. Bioph. (1965), II2, 524.
69. LYR H., NOVAK E.- Vergleichende Untersuchungen über die Bildung von Cellulasen und Hemicellulasen bei einigen Pilzen. Zeit. Allg. Mikrob. (1962), 2, 86.
70. LYR H.- Über das Vorkommen von Mannanasen in Pilzen. Zeit. Allg. Microb. (1963), 3, 25.
71. MACKIE W., PRESTON R.D.- The occurrence of mannan microfibrils in the green algae Codium fragile and Acetabularia crenulata. Planta. (1968), 79, 249.
72. MEIER H. On the structure of the cell walls and cell wall mannans from Ivory nuts and from Dates. Biochim. Biophys. Acta. (1958), 28, 229.
73. MONTGOMERY E., RICHTMEYER N.R., HUDSON C.S.- The preparation and rearrangement of phenyl-glycosides. J. Amer. Chem. Soc. (1942), 64, 690.
74. MUHLETHALER K.- Die Feinstruktur der Cellulosemikrofibrillen. Beih. Z. Schweiz. Forstverein. (1960), 30, 55.
75. MUHKERJEE S., SRIVASTAVA H.C.- Improved spray reagent for the detection of sugars. Nature. (1952), 169, 330.
76. MURATA T., AKAZAWA T., FUKUCHI S.- Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. I: An analytical study. Plant Physiol. (1968), 43, 1899.
77. NELSON N.- A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. (1944), 153, 375.
78. NOLTMANN E., BRINS F.H.- Phosphomannose Isomerase. I: Über die Aktivitätsmessung und die Sulphydryl sowie die Metalabhängigkeit der Enzymwirkung bei einigen tierischen Geweben. Biochem. Z. (1958), 330, 411.
79. OHTSUKI T.- Studies on reserve carbohydrates of four Amorphophallus species, with special reference to mannan. Bot. Mag. Tokyo. (1967), 81, 119.

80. OJIMA K., ISAWA T.- The variation of carbohydrates in various species of grasses and legumes. Can. J. Bot. (1968), 46, 1507.
81. PALLERONI N.J., DOUDOROFF M.- Mannose isomerase of Pseudomonas saccharophila. J. Biol. Chem. (1956), 218, 535.
82. PARKER C.B., LEEPER G.F.- Fine structure of polysaccharide microcrystals. Planta. (1969), 87, 86.
83. PARTRIDGE S.M.- Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature. (1947), 164, 443.
84. PEAT S., WHELAN W.J., EDWARDS T.E.- Polysaccharides of baker's yeast. IV: Mannan. J. Chem. Soc. (1961), 28.
85. PETEK F.- Chromatographie des sucres méthylés. Bull. Soc. Chim. France. (1965), 263.
86. PICKETT-HEAPS J.D.- The use of radioautography for investigating wall secretion in plant cells. Protoplasma. (1967), 64, 49.
87. PREISS J., WOOD E.- Sugar nucleotide reactions in Arthrobacter. I: Guanosine diphosphate mannose pyrophosphorylase: purification and properties. J. Biol. Chem. (1964), 239, 3119.
88. PURDIE T., IRVINE J.C.- The alkylation of sugars. J. Chem. Soc. (1903), 83, 1021.
89. REBERS P., SMITH F.- The constitution of Iles Mannans. J. Amer. Chem. Soc. (1954), 76, 6097.
90. REESE E.T., SHIBATA Y.- β mannanases of fungi. Can. J. Microb. (1965), 11, 167.
91. ROBINS W.W., BORTHWICK H.A.- Development of the seeds of Asparagus officinalis. Bot. Gazette. (1925), 80, 426.
92. ROLAND J.C.- Sur la sécrétion de la cellulose dans les parois des cellules végétales. C. R. Acad. Sci. Paris. (1967), 264, 2757.
93. ROLAND J.C., SANDOZ D.- Detection cytochimique des sites de formation des polysaccharides prémembranaires dans les cellules végétales. J. Microsc. (1969), 8, 263.
94. ROLAND J.C.- Mise en évidence sur coupes ultrafines de formations polysaccharidiques directement liées au plasmalemme. C. R. Acad. Sci. Paris. (1969), 269, 939.
95. SASSEN M.M.A.- Breakdown of the plant cell wall during the cell fusion process. Acta Bot. Neerl, (1965), 14, 165.
96. SAWARDEKER J.S., SLONEKER J.H.- Quantitative determination of monosaccharides by gas liquid chromatography. Anal. Chem. (1965), 37, 945.
97. SLEIN M.W.- Phosphomannose isomerase. J. Biol. Chem. (1950), 186, 753.
98. SMITH F., SRIVASTAVA H.- Acetolysis of the glucomannans of Iles mannans. J. Amer. Chem. Soc. (1956), 78, 1404.

99. SMITH F., SRIVASTAVA H.- Constitutional studies on the glucomannan of Konjak flour. J. Amer. Chem. Soc. (1959), 81, 1715.
100. SOMME R.- The structure of a galactomannan from Anthyllis vulneraria. Acta Chem. Scand. (1967), 21, 685.
101. STEPANENKO B.N.- Galactomannans and glucomannans of seeds, bulbs and rhizomes. Bull. Soc. Chim. Biol. (1960), 42, 1519.
102. STODDART R.W., NORTHCOTE D.H.- Metabolic relationships of the isolated ractions of the pectic substances of actively growing sycamore cells. Biochem. J. (1967), 105, 45.
103. STONE B.A.- Intracellular β glucan hydrolases. J. Ferm. Techn. (1967), 45, 687.
104. SWAIN R.R., DEKKER E.E.- Seed germination studies. II: Pathways for starch degradation in germinating pea seedlings. Biochem. Biophys. Acta. (1966), 122, 87.
105. SWEeley C.C., BENTLEY R., MAKITA M., WELLS D.D.- Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Amer. Chem. Soc. (1963), 85, 2497.
106. TAKAZAKI Y.- Kinetic and equilibrium studies on D-mannose-D-fructose isomerisation catalyzed by mannose isomerase from Streptomyces aerocolorigenes. Agric. Biol. Chem. (1967), 31, 435.
107. THIERY J.P.- Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microsc. (1967), 6, 987.
108. TO DONG - Contribution à l'étude des α galactosidases des Plantaginacées. Thèse Doct. Etat. Pharm. Paris. (1962).
109. TYMINSKI A., TIMELL T.E.- The constitution of a glucomannan from white spruce. J. Amer. Chem. Soc. (1960), 82, 2823.
110. VILLEMEZ C.L., LIN T.Y., HASSID W.Z.- Biosynthesis of the polygalacturonic acid chain of pectin by a particulate enzyme preparation from Phaseolus aureus seedlings. Proc. Nat. Acad. Sci. (1965), 54, 1626.
111. VILLEMEZ C.L., Mc NAB J.M., GRIMES W.J., ALBERSHEIM P.- Synthesis of the polysaccharides of plantcell walls by a subcellular particle. Fed. Proc. (1967), 26, 805.
112. VILLEMEZ C.L., Mc NAB J.M., ALBERSHEIM P.- Formation of plant cell wall polysaccharides. Nature. (1968), 218, 878.
113. WALLENFELS K., BECHTLER G., KUHN R., TRISCHMANN H., EGGE H.- Permethylation of oligomeric and polymeric carbohydrates and quantitative analysis of the cleavage products. Ang. Chem. Inter. Edit. Eng. (1963), 2, 515.
114. WHALEY W.G., MOLLENHAUER H.L.- The Golgi apparatus and cell plate formation. A postulate. J. Cell. Biol. (1963), 17, 216.
115. WHISTLER R., SMART C.L.- Polysaccharides chemistry. New York Acad. Press. (1959).
116. WINNY M.C., CATESSON A.M., GOLDBERG R.- Etude de l'activité phosphatasique des parois de suspensions cellulaires d'Erable. A paraître.

Planche I : Examen de coupes transversales de graines de
Jacinthe et d'Asperge.

P : paroi squelettique.
c : intérieur de la cellule.
A : albumen.
C : cotylédon.
pc : ponctuation.

1 : vue générale d'une coupe transversale de graines de Jacinthe (microscope électronique "stéréoscan".x100).

2 : détail de la vue précédente (x 800).

3 : coupe transversale d'une graine d'Asperge (microscope photonique, x750).



Planche II : Etude des substances membranaires en
lumière polarisée.

pc : ponctuation.
p : paroi.

- 1: coupe transversale d'une graine de Jacinthe (x 400).
- 2 : détail de la vue précédente (x 800).
- 3.: glucomannanes extraites des graines d'Asperge (x1600).



Planche III : Mise en évidence de la structure fibrillaire
des constituants membranaires.

Les coupes semi-fines sont traitées par l'eau oxygénée (110 v)
pendant 20 heures. Ombrage au germanium puis examen au mi-
croscope électronique.

1 : x 30000.

2 : x 40000.

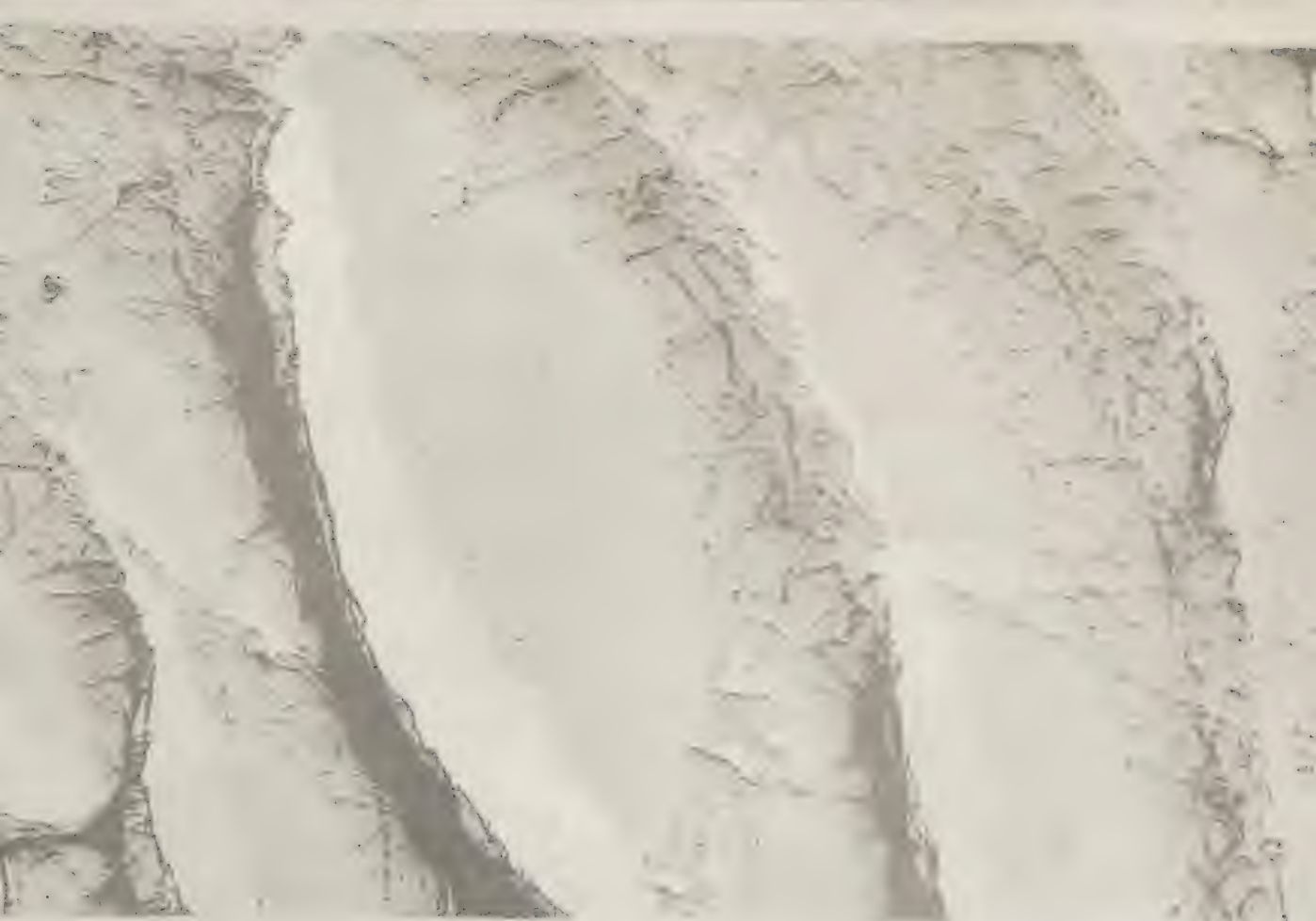


Planche IV : Mise en évidence de la structure fine des fibrilles.

Observations au microscope électronique.

- 1 : portion de paroi d'albumen d'Asperge après action de H_2O_2 puis test des polysaccharides (TCH-protéinate d'argent). Le calibre des fibrilles est variables (x90000).
- 2 : portion de paroi d'albumen de Jacinthe après action de H_2O_2 puis test des polysaccharides. Le profil des composants les plus fins est marqué par une double ligne de grains métalliques (flèche). Lorsqu'ils sont groupés en microfibrilles F, le nombre et la dimension des grains d'argent ne permettent pas de repérer le détail de la structure interne (x 170000).
- 3 : constituants fibrillaires de Jacinthe après coloration négative (acétate d'uranyle 0,5 M). Les fibrilles unitaires sont bien visibles (flèche). Certaines sont appariées. Une microfibrille F, de 250 Å de diamètre montre sa structure hétérogène, fasciculée. La microfibrille F, en se fondant dans un ensemble plus volumineux, perd son individualité alors que les fibrilles unitaires restent parfaitement différenciées (x 200000).

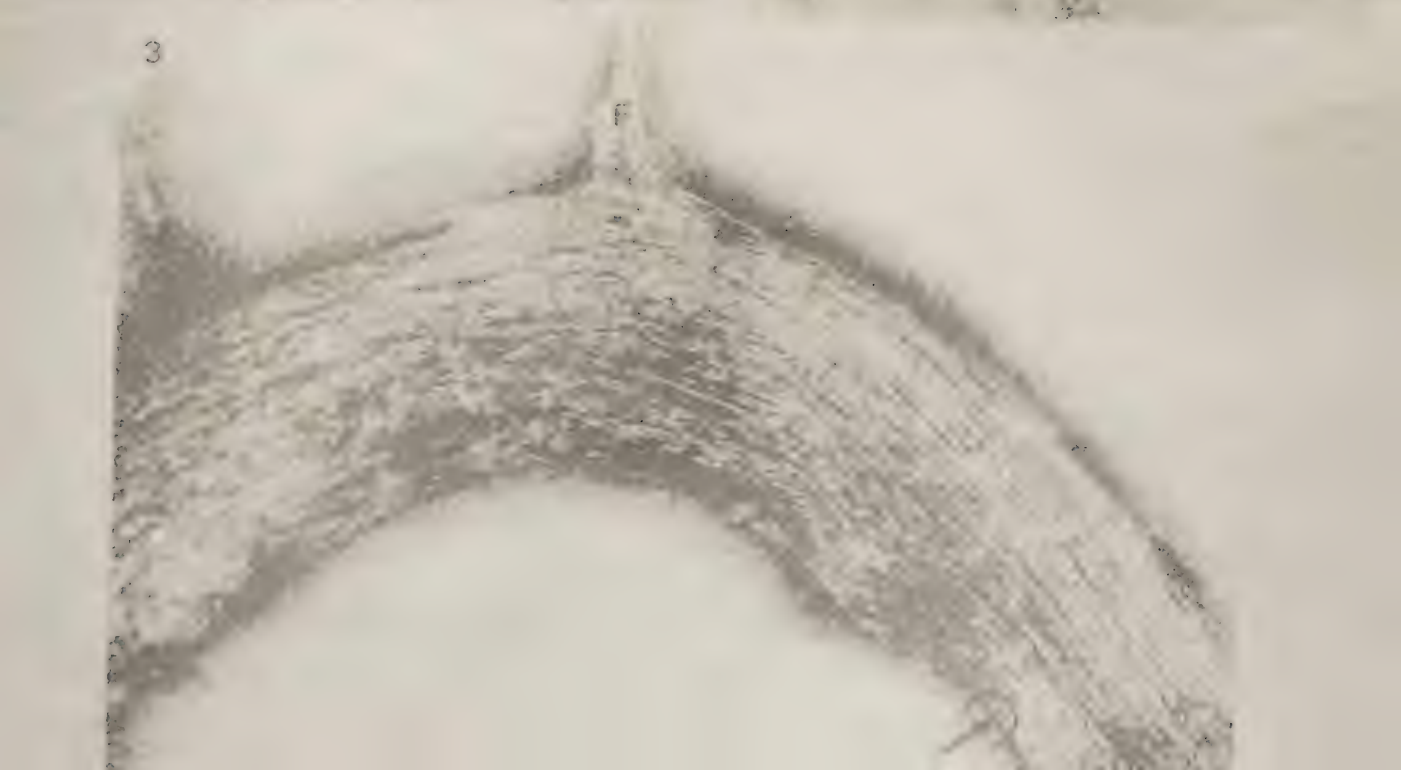
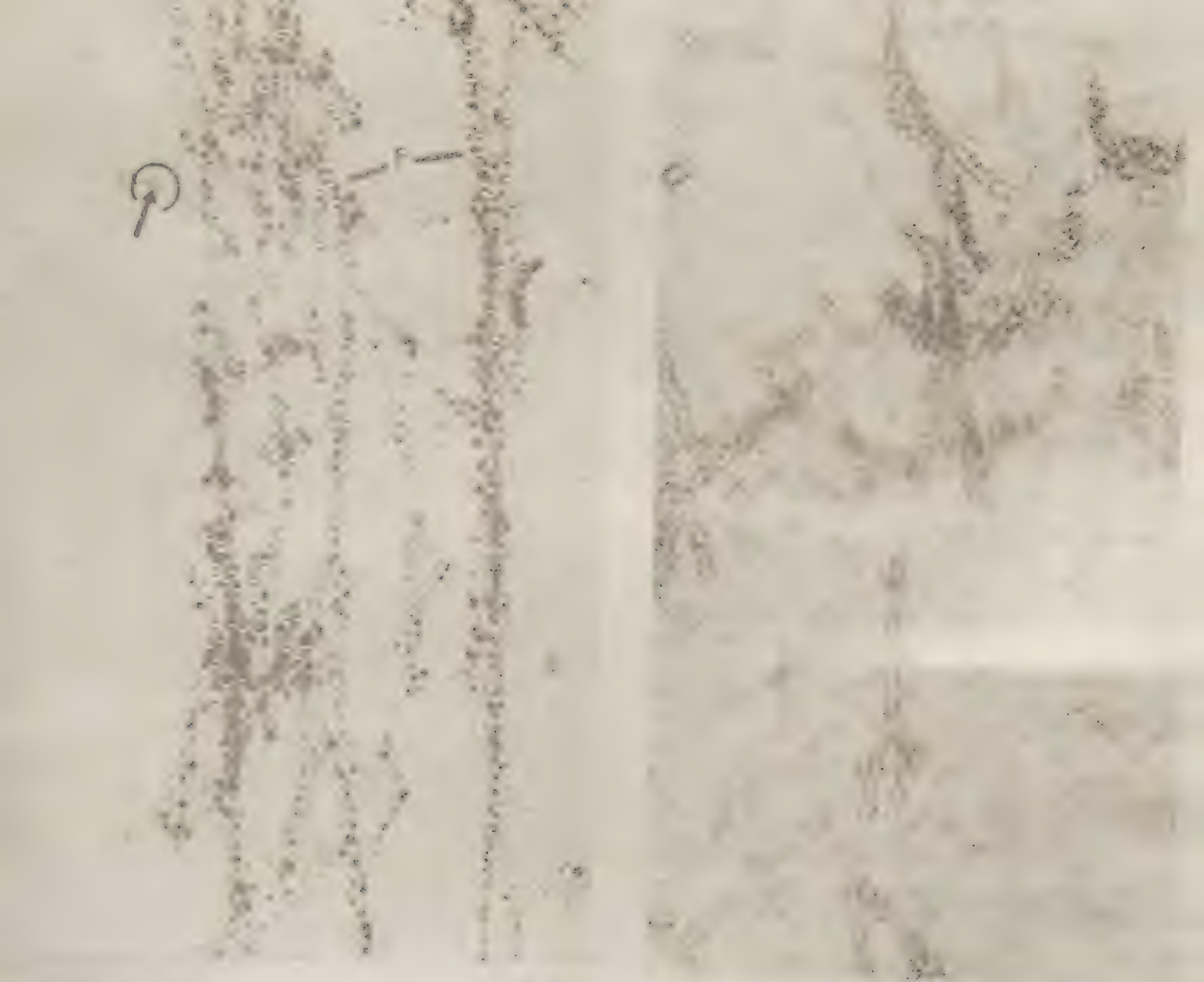


Planche V : Etude de la maturation des graines de Jacinthe.

Observations au microscope photonique. Coloration de Mac Manus.

A : albumen.

E : embryon.

p : paroi.

pc: ponctuation.

1 : vue générale d'une coupe transversale d'une graine très jeune
(x 30).

2 : cellules de l'albumen d'une graine très jeune (x 400).

3 : cellules de l'albumen à un stade plus avancé (x 400).

4 : détail de la vue précédente (x 1000).

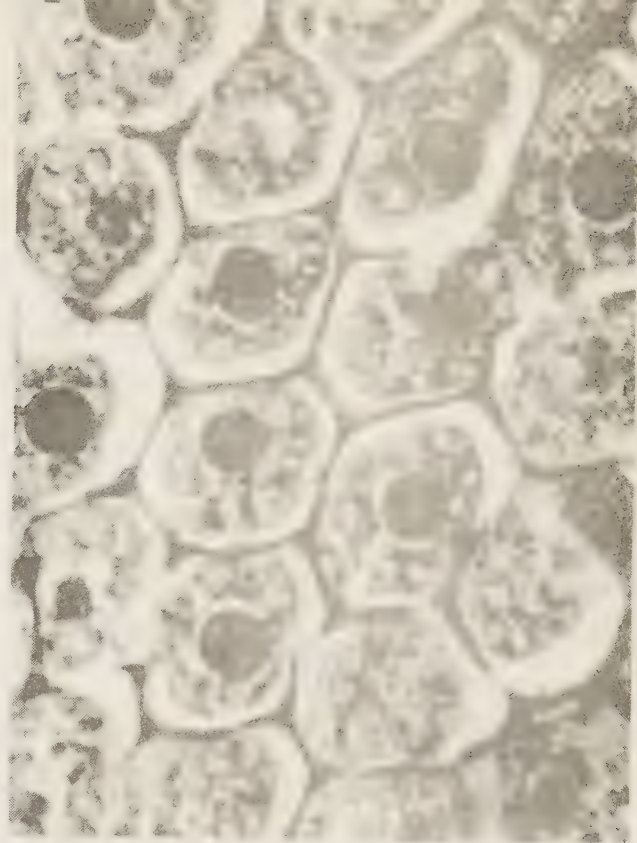


Planche VI : Maturation des graines de Jacinthe (stade jeune).

Examen au microscope électronique après coloration des polysaccharides
(méthode de Thiéry).

p : paroi.

r.es.: replis de la membrane ectoplasmique.

ps. : polysaccharides nouvellement formés.

Les polysaccharides (ps.) semblent se former dans des replis de la
membranes plasmique (r. es.).

1 : x 40000.

2 : x 55000.



Planche VII : Maturation des graines de Jacinthe.

Examen au microscope électronique après coloration selon la méthode de Thiéry.

- 1 : stade très jeune. Les polysaccharides membranaires forment un ensemble lâche et d'aspect fibrillaire (x 75000).
- 2 : stade plus avancé. Les polysaccharides membranaires forment un ensemble extrêmement compact (x 30000).



Planche VIII : Maturation des graines de Jacinthe. Aspect
général d'une cellule de l'albumen.

Examen au microscope électronique après coloration selon la méthode
de Thiéry.

L'appareil de Golgi est apparent avec des vésicules remplies de poly-
saccharides.

p : paroi .

G: appareil de Golgi.

vg.: vésicule golgienne.

(x 60000).



Planche IX : Mise en évidence du rôle de l'appareil de Golgi.

Examen au microscope électronique après coloration selon la méthode de Thiéry.

p : paroi.

vg.p.: vésicule golgienne remplie de polysaccharides.

vg.v.: vésicule golgienne vide.

1 : partie externe d'une cellule de l'albumen (graine de Jacinthe à un stade avancé). (x 40000).

2 : périphérie d'une cellule de l'albumen (graine de Jacinthe à un stade avancé). Les vésicules golgiennes migrent vers la périphérie de la cellule et se vident dans l'espace sous membranaire (x 50000).



Planche X : Germination des graines d'Asperge.

Examen au microscope photonique après coloration de Mac Manus.

A : albumen.

C : cotylédon.

Z : zone intermédiaire.

ép.c. : épiderme cotylédonaire.

1,2,3 : zone intermédiaire à divers stade de développement.

1 : x 180.

2 : x 200.

3 : x 200.

4 : détail de la vue précédente (x 300).

Entre l'albumen et le cotylédon se forme, aux dépens des couches de cellules les plus internes de l'albumen, une zone constituées essentiellement de débris membranaires.



Planche XI : Germination des graines d'Asperge.

Examen au microscope électronique après coloration selon la méthode de Thiéry.

P : paroi .

pc:ponctuation.

v : vacuole.

m : membrane primaire.

1 : cellules intactes de l'albumen. (x 75000).

2 : cellules au contact du cotylédon. A l'emplacement des parois squelettiques persiste essentiellement la membrane primaire (x 60000).

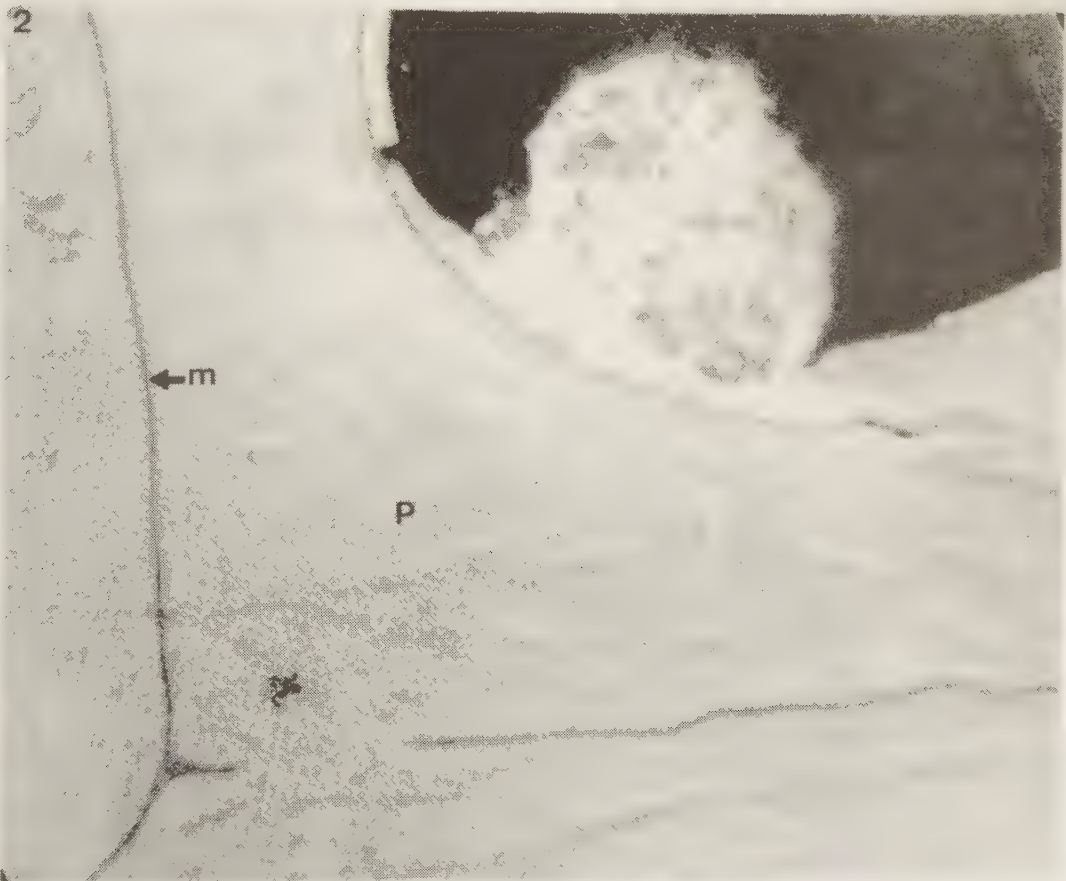
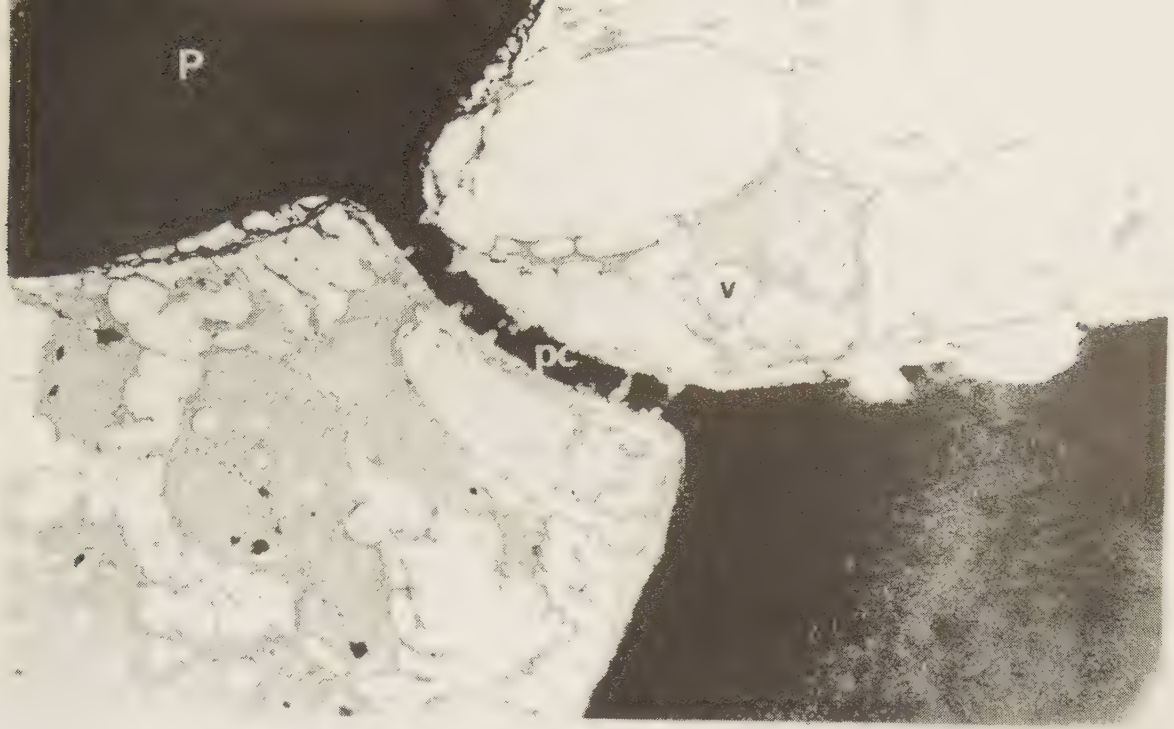


Planche XII : Germination des graines d'Asperge.

Examen au microscope électronique après ombrage au germanium.

1 : parois cellulaires encore intactes. (x 50000).

2 : parois cellulaires attaquées (x 40000).



Planches XIII et XIV : Dégradation des parois cellulaires au cours
de la germination des graines d'Asperge.

Examen au microscope électronique après ombrage au germanium.

Les figures des planches XIII et XIV montrent des stades de dégradation de plus en plus avancés.

XIII, 1 : x75000.
2 : x150000.

XIV, 1 : x10000.
2 : x150000.





DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Vu et approuvé

Paris, le 16 Avril 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

Marc. ZAMANSKY

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Robert MALLET

